



Journée médico-technique

06/11/2018



**Carrefour  
Pathologie**  
2018

# LA BIOPSIE LIQUIDE

**Benjamin BONHOMME**

Département de Biopathologie - Institut Bergonié (Bordeaux)



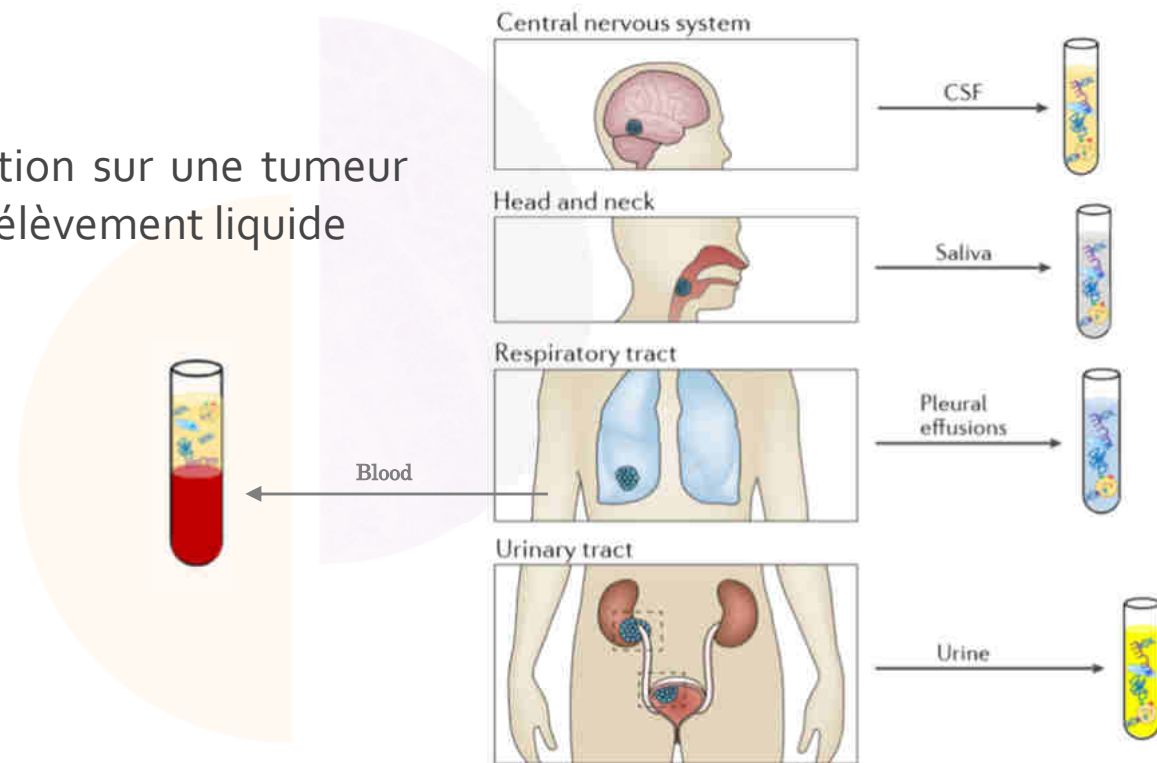
# Introduction : concept de biopsie liquide

## ▶ Objectif :

- ▶ Obtenir une information sur une tumeur solide à partir d'un prélèvement liquide

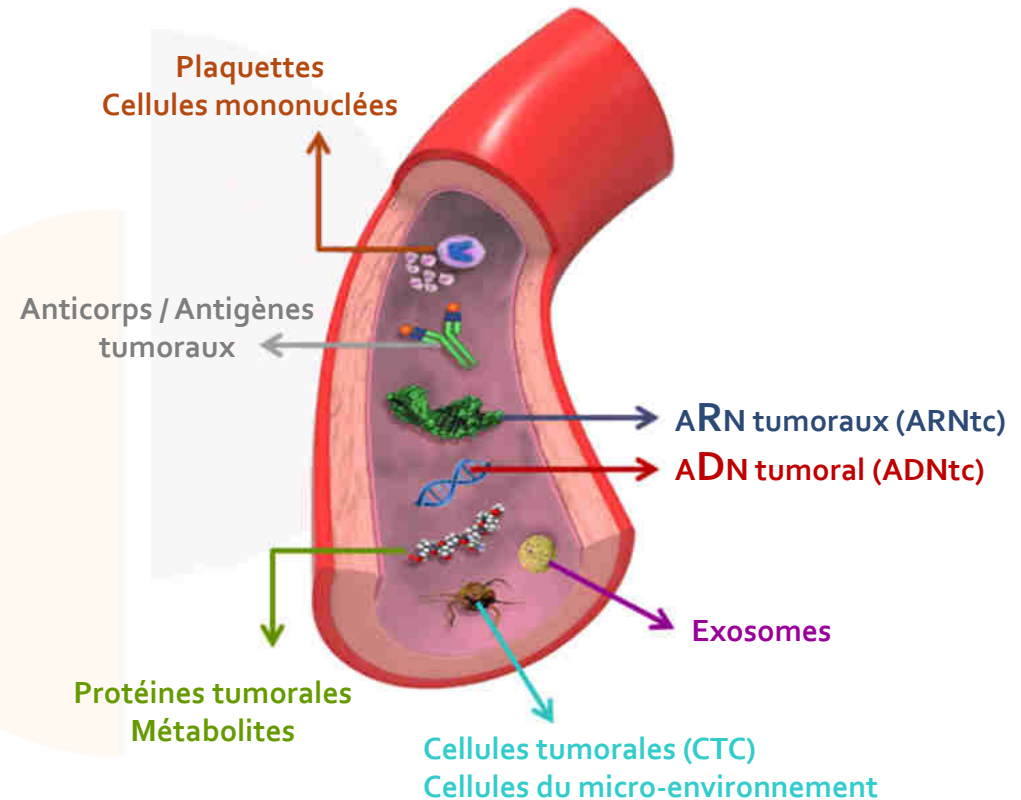
## ▶ Substrats :

- ▶ Sang +++
- ▶ LCS
- ▶ Urine
- ▶ Salive
- ▶ ...



# Introduction : concept de biopsie liquide

Composants tumoraux  
de la biopsie liquide  
théoriquement  
analysables



# La biopsie liquide

---

- ▶ ADN tumoral circulant (ADNtc)

Applications en routine en 2018

- ▶ Cellules tumorales circulantes (CTC)

Futur rôle pour le pathologiste ?

# ADN tumoral circulant : origine(s)

## Mécanismes passifs

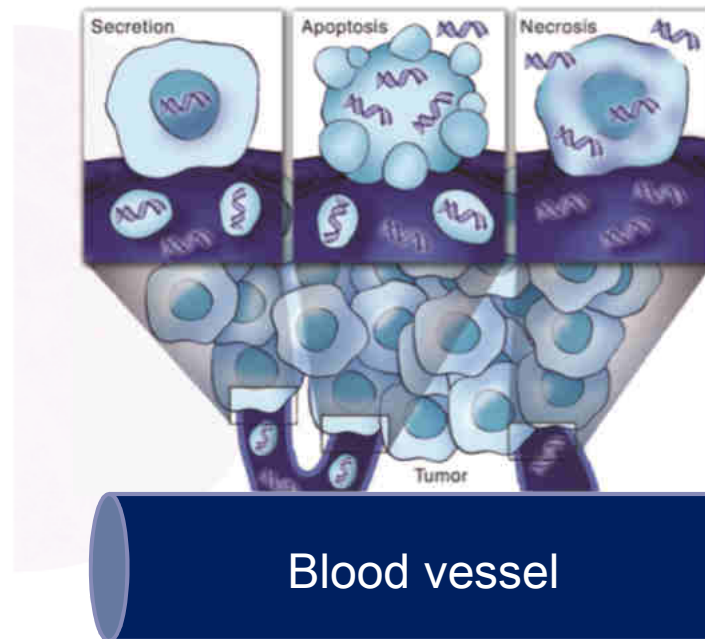
Apoptose | ADN/ARN dégradés  
Nécrose

## Mécanismes actifs

Relargage actif spontané (exosomes)

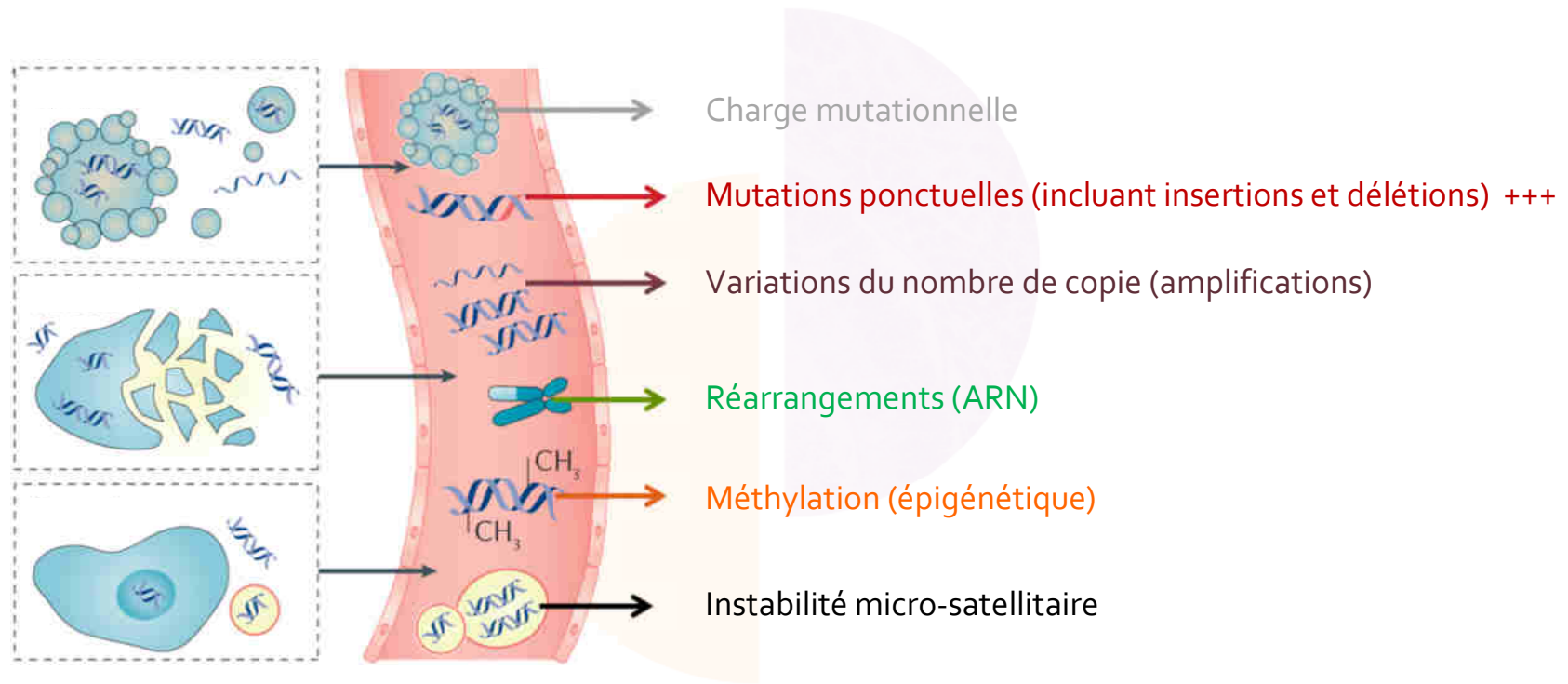
## Variations

- ↳ résorption (macrophages) - 1/2 vie : 2h
- ↗ phénomène (physio-)pathologique :
  - inflammation
  - maladie métabolique
- ↳ ADN génomique (non tumoral)



ADNc = ADNc tumoral + ADNc génomique

# ADN tumoral circulant : analyses



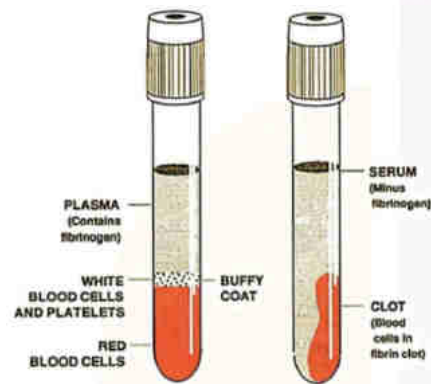
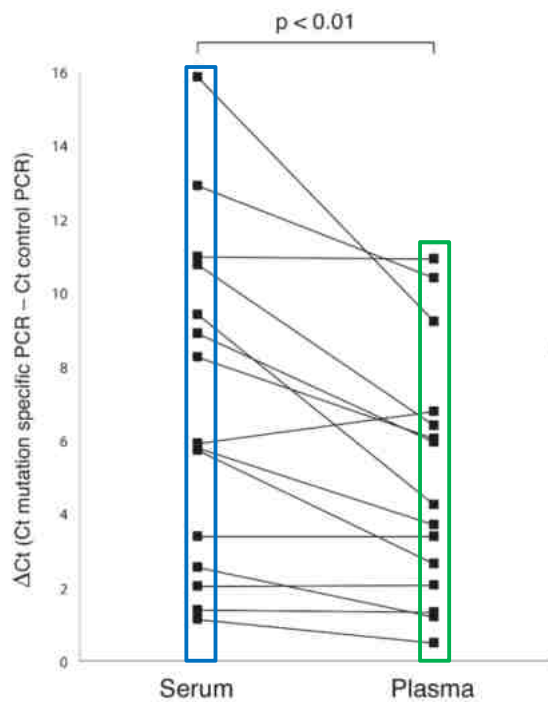
## ADN tumoral circulant : problématiques pratiques

---

- ▶ Liées au **prélèvement** (conservation et stockage)
- ▶ Liées au **matériel** (quantité d'ADN)
- ▶ Liées à la **technique** (sensibilité ou exhaustivité ?)

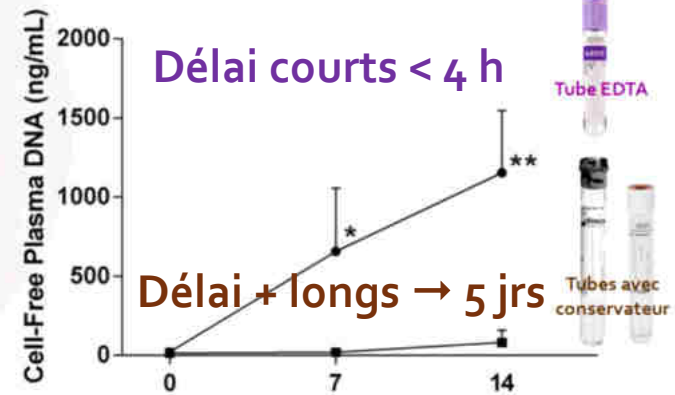
# ADN tumoral circulant : problématiques pratiques

- ▶ Liées au **prélèvement** (conservation et stockage)



Subgroups	Number of Studies (Matched Specimen)	Estimate, 95% CI	I <sup>2</sup> , %
Plasma	12 (1391)	0.65 (0.51 to 0.77)	80.2
Serum	10 (412)	0.56 (0.35 to 0.75)	69.0

[ADNc]<sub>plasma</sub> en fonction du délai entre prélèvement et extraction



Contamination du sérum par ADN génomique (leucocytes)

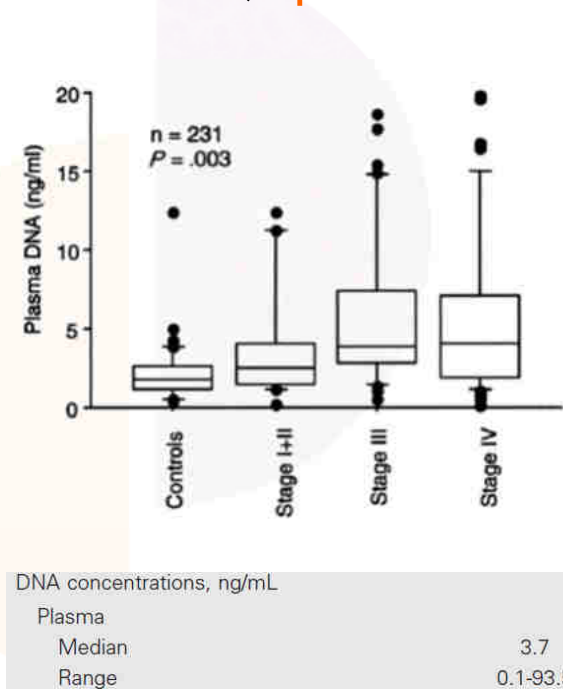
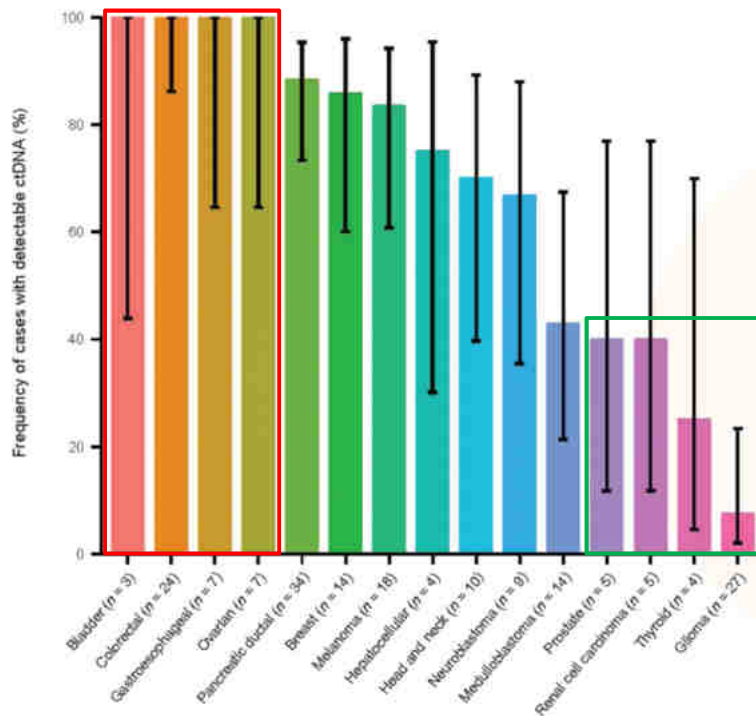
→ Plasma = choix optimal

Stockage ADN : -20°C à -40°C



# ADN tumoral circulant : problématiques pratiques

- ▶ Liées au matériel (quantité d'ADN): primitif et stade

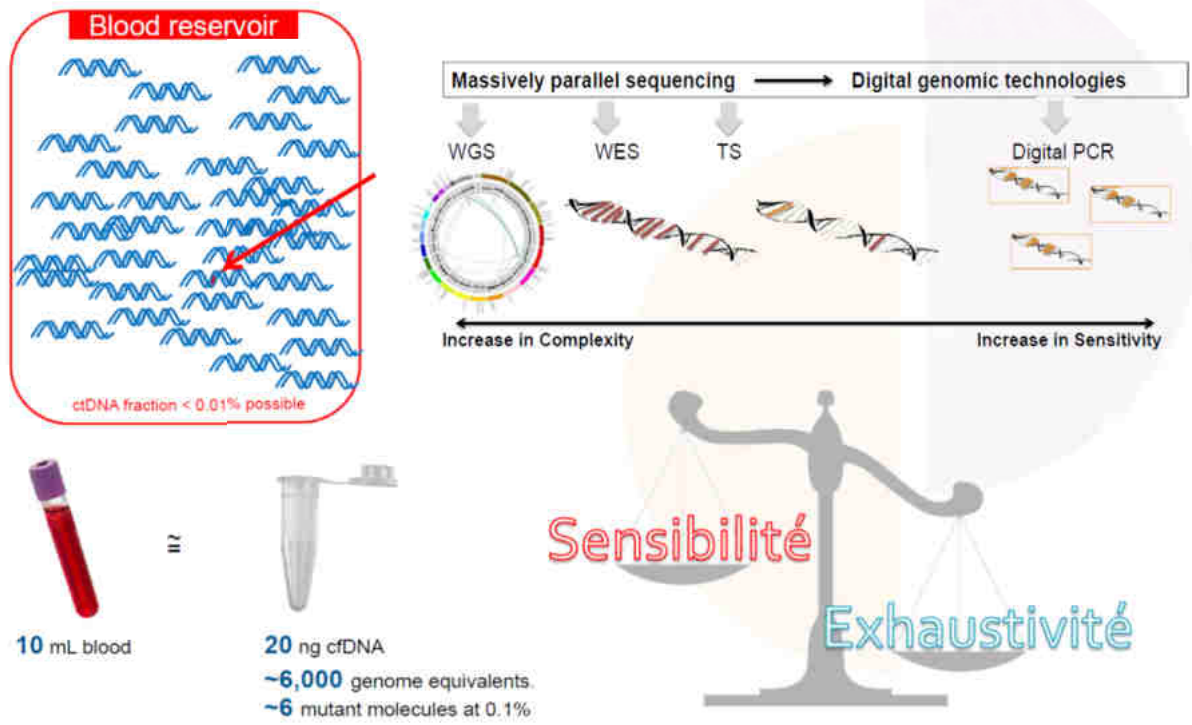


Stade métastatique  
→ 50%

Stade précoce  
Thérapie ciblée  
< 1%

# ADN tumoral circulant : problématiques pratiques

- ▶ Liées à la **technique** (sensibilité ou exhaustivité ?)



Méthode	Sensibilité
Séquençage Sanger	> 10%
Pyroséquençage	10%
Séquençage de nouvelle génération	<b>&lt; 0,1 %</b>
PCR quantitative en temps réel	1%
PCR quantitative en temps réel optimisée	0,1%
PCR digitale	0,001%

# ADN tumoral circulant : concordance tissu-plasma

**Table 1. Sensitizing Mutations for Treatment-Naïve Patients**

Platform	Patients	Alteration	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Concordance (%)	Ref
cofas	238 patients from the SREACT-2 study	L858R and exon 19 deletion	96	75	88	77
cofas	156 patients with LUAD	L858R and exon 19 deletion	96	60	91	138
qPCR	96 patients from EURTAC study with either L858R or exon 19 deletion	L858R and exon 19 deletion	—	78	—	38
qPCR	170 newly diagnosed patients with nonpapillary NSCLC with either L858R or exon 19 deletion	EGFR exon 19 deletion	100	86	91	17
		EGFR L858R mutation KRAS G12X mutation	100	89	80	
qPCR	58 patients from South Korea	L858R exon 19 deletion	—	100	87.9	75
				76.5	86.2	
BEAMing	Retrospective cohort of 216 patients from the AURA-1 study	L858R exon 19 deletion	97	86	—	179
BEAMing	38 patients from the AURA-1 trial	L858R exon 19 deletion	100	82	—	
			93	93	95	130
cofas	38 patients from the AURA-1 trial	L858R exon 19 deletion	100	90	97	138
qPCR	38 patients from the AURA-1 trial	L858R	100	96	99	130
BEAMing	72 patients from the AURA-1 trial	L858R exon 19 deletion	97	87	—	130
cofas	72 patients from the AURA-1 trial	L858R exon 19 deletion	97	82	—	130
cofas	228 patients from the AURA-3 trial	L858R exon 19 deletion	100	79	—	131
qPCR	208 patients from the AURA-3 trial	L858R exon 19 deletion	95	85	—	131
qPCR	208 patients from the AURA-3 trial	L858R exon 19 deletion	100	72	—	131
NGS	227 patients from the AURA-3 trial	L858R exon 19 deletion	99	62	—	131
			99	81	—	
BEAMing	Retrospective cohort of 44 patients with confirmed EGFR mutation	EGFR activating alterations	—	72.7	—	133
NGS	Prospectively enrolled cohort of 145 patients with stage II-IV solid tumors	54 genes panel	99	85	—	57
NGS	50 prospectively enrolled patients with NSCLC	70 genes panel	—	—	79	133
NGS	68 nonsmoker patients with NSCLC	EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2, and PDGfra genes	87	58	68	81
qPCR	Cohort of 32 patients with NSCLC with 14 patients having an ALK rearrangement confirmed by primary tumor mol. flow PCR and/ or FISH	ALK rearrangement	100	21	—	62
qPCR	Retrospective cohort of 102 consecutive patients with lung adenocarcinoma	ALK rearrangement	100	91	—	134
NGS	88 retrospectively enrolled consecutive patients with LUAD	EGFR alterations detection	—	—	80.8	135
NGS	181 patients with NSCLC	EGFR alterations detection	—	—	76	132
qPCR	Retrospective cohort of 107 patients with lung adenocarcinoma	BRAF mutation	93	38.6	—	101
NGS	48 patients with advanced, progressive NSCLC	Diverse alterations	100	77	—	136

qPCR, qualitative PCR; qdPCR, digital droplet PCR; NGS, next-generation sequencing; ALK, ALK receptor tyrosine kinase; L858R, lung adenocarcinoma; BEAMing, breath, medium, amplification and enzymatic PCR; polymerase chain reaction; FISH, fluorescence in situ hybridization; Ref., reference number.

- ▶ Primo détermination statut *EGFR*
- ▶ Mutation de sensibilité :
  - ▶ délétion (exon 19)
  - ▶ L858R (exon 21)
- ▶ 24 études comparaison tissu-plasma (2011-2017)
- ▶ Techniques variées (ciblées et exhaustive)

Sensibilité plasma	Spécificité plasma	Concordance tissu-plasma
21-100%	93-100%	68-97%

# ADN tumoral circulant : concordance tissu-plasma

- ▶ Rechute sous inhibiteur de tyrosine kinase
- ▶ Mutation de résistance *EGFR* :
  - ▶ T790M (exon 20)
- ▶ 18 études comparaison tissu-plasma (2011-2017)
- ▶ Techniques variées (ciblées et exhaustive)

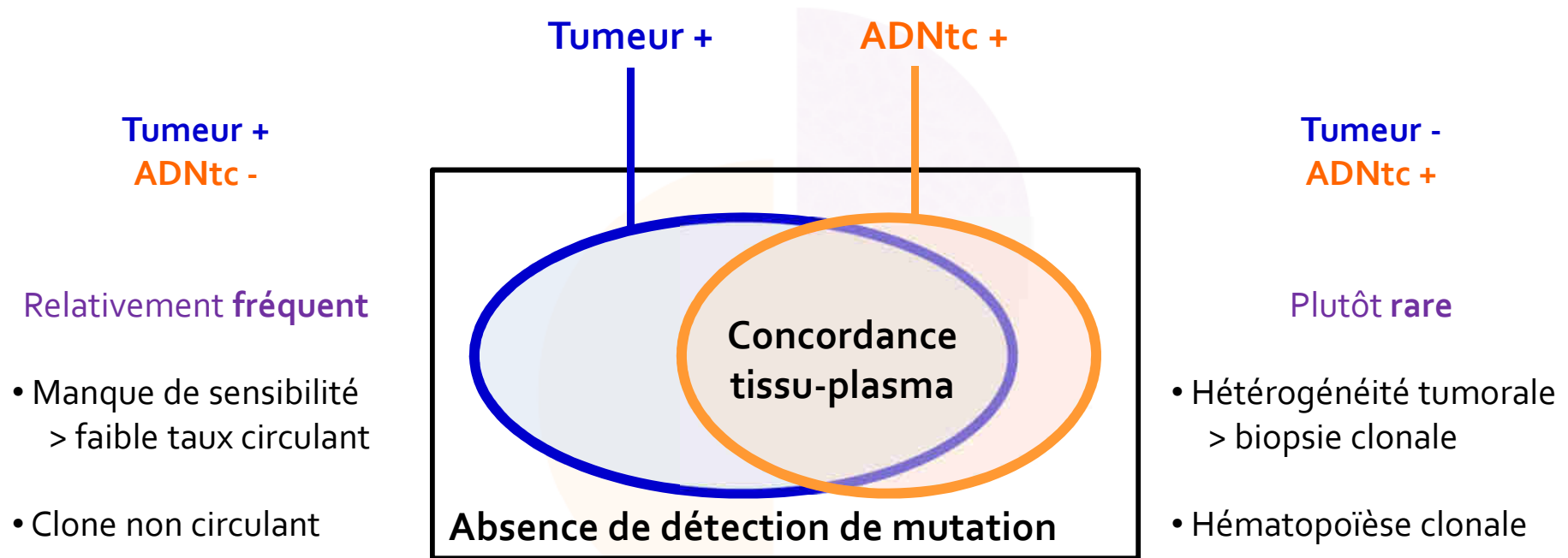
**Table 2. Detection of T790M in ctDNA**

Platform	Patients	Alteration	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Concordance (%)	Ref
Cobas	24 patients with NSCLC treated with Nivolumab	T790M	—	—	61.4% positive agreement 78.6% negative agreement	101
ddPCR	60 patients progressing after EGFR TKI treatment	T790M	63	77	—	112
BEAMing	Retrospective cohort of 216 patients from the AURA 1 study	T790M	69.0	70	—	129
BEAMing	23 patients progressing after a EGFR TKI	T790M	—	10 mutations detected	—	132
cobas	38 patients from the AURA 1 trial	T790M	100	41	57	130
ddPCR	38 patients from the AURA 1 trial	T790M	83	71	74	130
BEAMing	38 patients from the AURA 1 trial	T790M	67	71	70	130
cobas	72 patients from the AURA 1 trial	T790M	67	73	—	130
BEAMing	72 patients from the AURA 1 trial	T790M	58	81	—	130
cobas	226 patients from the AURA 3 trial	T790M	—	51	—	131
ddPCR	208 patients from the AURA 3 trial	T790M	—	57	—	131
NGS	227 patients from the AURA 3 trial	T790M	—	65%	—	131
NGS	100 patients with NSCLC	T790M	—	T790M was identified in 4 tumor DNA samples and 8 ctDNA samples	—	133
NGS	63 patients with cancer (51 were NSCLC and 48 were stage IIB-IV)	T790M	100	90.5	97	52
qPCR	306 patients with NSCLC from AURA 17	T790M	—	49	—	137
cobas	306 patients with NSCLC from AURA 17	T790M	—	42	—	137
ddPCR	306 patients with NSCLC from AURA 17	T790M	—	56	—	137
NGS	48 patients with NSCLC	T790M	—	A comparison was not present; this mutation was detected in 50% of the patients.	—	138

qPCR, qualitative PCR; ddPCR, digital droplet PCR; NGS, next-generation sequencing; TKI, tyrosine kinase inhibitor; ctDNA, circulating tumor DNA; BEAMing, beads, emulsions, amplification and magnets; PCR, polymerase chain reactor; Ref, reference number.

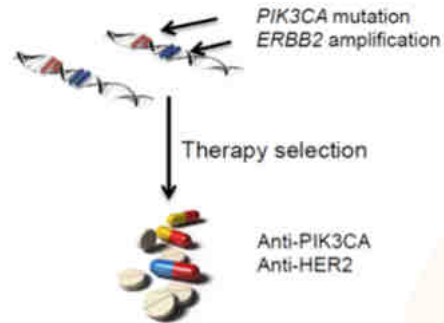
Sensibilité plasma	Spécificité plasma	Concordance tissu-plasma
41-90,5%	58-100%	57-97%

# ADN tumoral circulant : concordance tissu-plasma

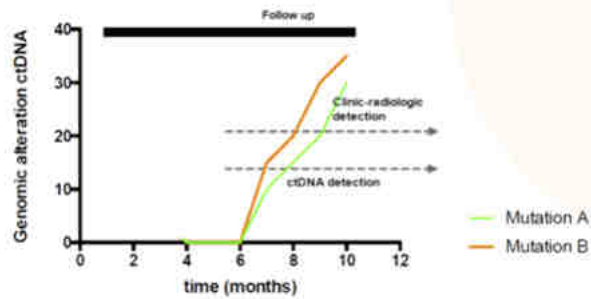


# ADN tumoral circulant : applications cliniques

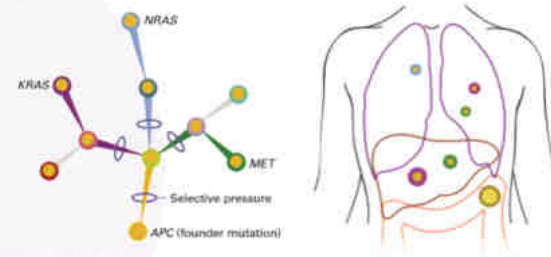
## Stratification théranostique



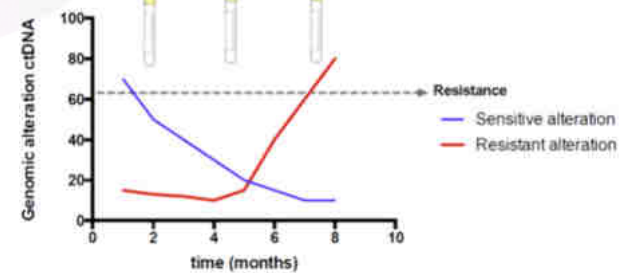
## Dépistage / Diagnostic précoce



## Hétérogénéité intra-inter tumorale



## Suivi longitudinal (pronostique) réponse / maladie résiduelle / résistance



# ADN tumoral circulant : routine diagnostique en 2018

## ► Recommandations (Groupe Français de Cytogénomique Oncologique)

### Primo-détermination statut EGFR

Tissu (référence)



→ si matériel tissulaire insuffisant  
→ si analyse sur tissu non contributive

ADN circulant

### Rechute sous inhibiteur de TK (1<sup>ère</sup>/2<sup>ème</sup> G)

ADN circulant itératifs



→ si absence de détection de mutation

TISSU (si possible)

# La biopsie liquide

---

- ▶ ADN tumoral circulant (ADNtc)

Applications en routine en 2018

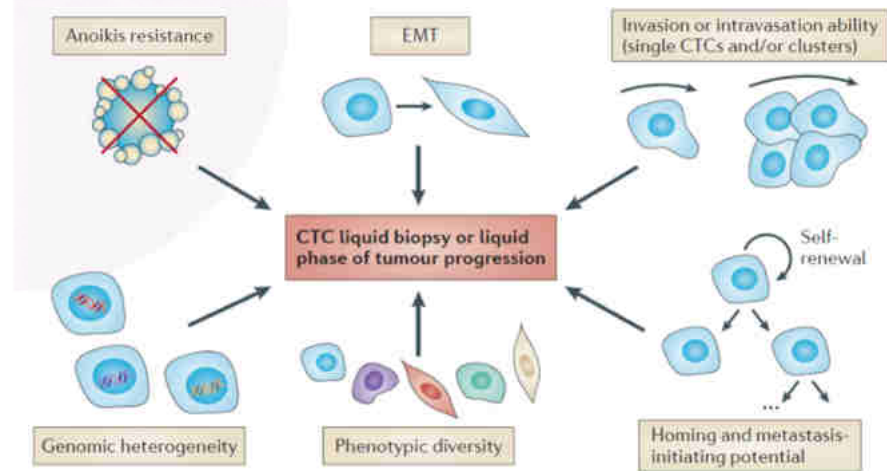
- ▶ Cellules tumorales circulantes (CTC)

Futur rôle pour le pathologiste ?



# Cellules tumorales circulantes : définition

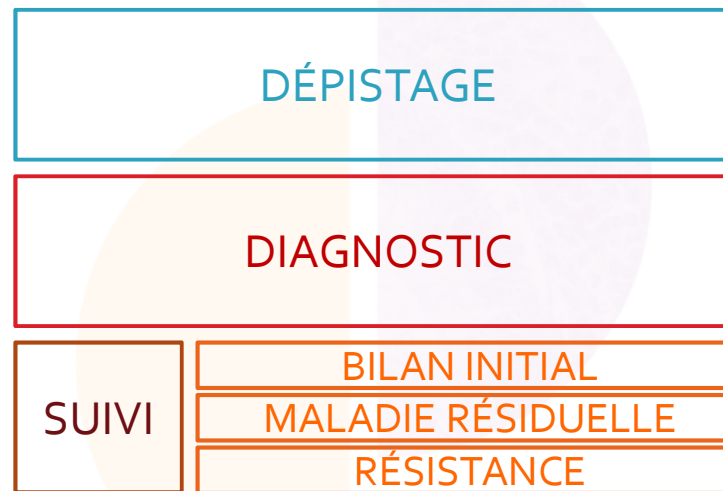
- ▶ **Rares** : 1 CTC / 1 milliard de cellules hématologiques  
1 à 10 / 10 ml de sang
- ▶ **Cellules non hématologiques circulantes (CNHCs) :**
  - ▶ Cellules épithéliales circulantes :
    - ▶ non tumorales
    - ▶ cellules tumorales bénignes
    - ▶ **cellules tumorales malignes**
  - ▶ Cellules endothéliales circulantes :
    - ▶ non-tumorales
    - ▶ liées à la néo-angiogenèse tumorale
  - ▶ Cellules mésenchymateuses



# Cellules tumorales circulantes : applications cliniques

---

- ▶ **En théorie** : ≈ ADN tumoral circulant



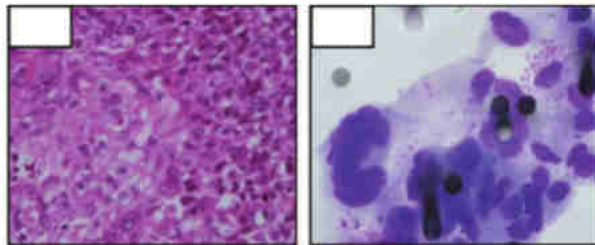
- ▶ **En routine (2018)** :

- ▶ Aucune !

# Cellules tumorales circulantes : caractérisation

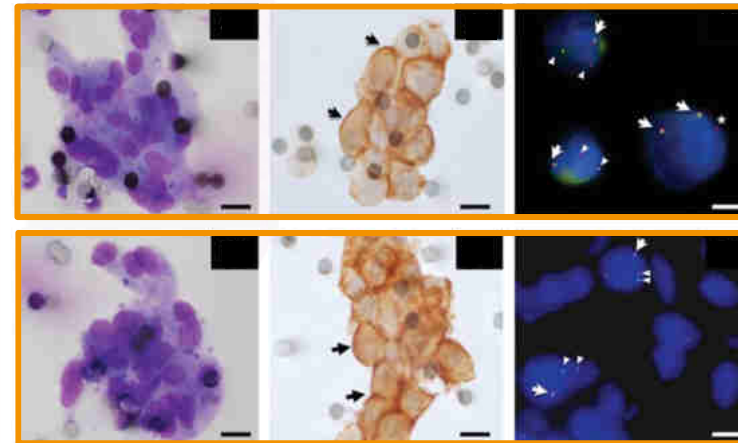
## ▶ Cytologie

### Critères cytologiques



## ▶ Immunocytochimie

## ▶ FISH



Cohorte de patients atteints de CBNPC  
Immunocytochimie ALK (clone 5A4) + FISH ALK (x1000)  
Méthode d'isolement des cellules ISET « Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells »

# Cellules tumorales circulantes : limites

---

- ▶ Facteurs limitants le développement des CTC :
  - ▶ Faible **nombre** et **fragilité**
  - ▶ Méthodes d'**isolement** et **pré-analytique complexes**
  - ▶ **Faux-négatifs**
    - ▶ transition épithélio-mésenchymateuse
    - ▶ potentiel invasif ?
  - ▶ **Faux-positifs**
    - ▶ cellules non hématologiques circulantes
  - ▶ Peu de **preuve de la validité et utilité cliniques** de leurs utilisations

## CONCLUSION : Take-home messages (1/2)

---

- ▶ La place de la biopsie liquide va-t-elle être croissante ?

OUI

- ▶ Caractère non/peu invasif
- ▶ Possibilités techniques croissantes
- ▶ Investissement de champs non concernés par la pathologie :
  - ▶ Dépistage
  - ▶ Suivi longitudinal (efficacité thérapeutique / rechute précoce)
  - ▶ Hétérogénéité tumorale

## CONCLUSION : Take-home messages (2/2)

---

- ▶ La biopsie liquide va-t-elle remplacer la biopsie tissulaire ?

**NON**

- ▶ La « biopsie liquide » n'a de valeur que positive
- ▶ Matériel moléculaire en quantité suffisante sur tissu
- ▶ Place du pathologiste (?) dans le champ de la biopsie liquide :
  - ▶ Caractérisation morphologique des cellules tumorales circulantes
  - ▶ Immunocytochimie (caractérisation phénotypique)
  - ▶ FISH (caractérisation génétique)



Journée médico-technique

06/11/2018



**Carrefour  
Pathologie**  
2018

# LA BIOPSIE LIQUIDE

Merci de votre attention !

