

Nouvelles méthodes de détection de l'ADN tumoral circulant par PCR digitale en gouttelettes : application au suivi des patients

Fanny Garlan

► To cite this version:

Fanny Garlan. Nouvelles méthodes de détection de l'ADN tumoral circulant par PCR digitale en gouttelettes : application au suivi des patients. Cancer. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB108 . tel-02145652

HAL Id: tel-02145652 https://theses.hal.science/tel-02145652

Submitted on 3 Jun 2019 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





Université Paris Descartes Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales UMRS1147 - MEPPOT Ecole doctorale : Frontières du Vivant

Thèse pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université Paris Descartes** Discipline : **Recherche Translationnelle**

Présentée et soutenue publiquement par :



Fanny Garlan



Le 25 Novembre 2016

NOUVELLES METHODES DE DETECTION DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT PAR PCR DIGITALE EN GOUTTELETTES : APPLICATION AU SUIVI DES PATIENTS.

Membres du jury :

Rapporteur : Pr. Paul Hofman, IRCAN, Université de Nice Sophia-Antipolis, Nice.
 Rapporteur : Dr. François-Clément Bidard, Institut Curie, Paris.
 Examinateur : Pr. Marc Denis, Centre hospitalo-universitaire de Nantes, Nantes.
 Examinateur : Pr. Pierre Laurent-Puig, Université Paris Descartes, Paris.
 Directrice de thèse : Dr. Valérie Taly, Université Paris Descartes, Paris.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	7
Résumé de thèse	_ 9
Liste des articles scientifiques, présentations et poster	_ 11
Liste des figures et Tableaux	_ 13
Abréviations	17
Introduction	- 19
 I. Les biomarqueurs du cancer	_ 19 _ 19 _ 20 _ 24 _ 26 de _ 31 _ 33 _ 34
extracellulaires et acides nucléiques circulants II.ii. Les ADN circulants : historique de l'ADNtc et caractéristiques biologiques II.iii. Application de la détection l'ADNtc à de nouvelles altérations: vers de nouvea marqueurs circulants spécifiques de la tumeur II.iv. Applications cliniques de la détection de l'ADNtc II.v. Enjeux relatif à la détection sensible et quantitative de l'ADNtc	_ 35 _ 41 aux _ 43 _ 46 _ 49
 III. Techniques de détection de l'ADN tumoral circulant	_ 50 _ 50 _ 51 n
microchambres	_ 53 n _ 55 n _ 57 _ 62 en
gouttelette IV. Applications de la PCR digitale en gouttelettes à la détection biomarqueurs circulants IV.i. Apport de la PCR digitale en gouttelettes pour l'analyse d'échantillons biologiques IV.ii. Sensibilité de la détection d'ADNtc par PCR digitale en gouttelettes	65 66 66 67
IV.III. Detection de l'ADINIC dans le cas de cancers precoces, enjeu predictif	- 68

IV.iv. Suivi de la masse tumorale	68
IV.v. Apport de la PCR digitale en gouttelettes pour la détection de l'ADNtc dans	
d'autres biofluides	69 70
IV.VI. Application a la detection de biomarqueurs emergents	70
 V. Couplage de la PCR digitale au séquençage nouvelle génération (NGS) pour l détection précise de biomarqueurs 	a 71
V.i. Le séquençage nouvelle génération	71
V.ii. Applications à la détection d'ADNtc	72
V.iii. Intégration de la PCR digitale en gouttelettes aux analyses par NGS	73
V.iv. Optimisation du NGS par la PCR digitale en gouttelettes : enrichissement cibl	lé 75
V.v. Couplage du NGS et de la PCR digitale en gouttelettes pour le diagnostic, le	
suivi, et l'orientation thérapeutique des patients	76
VI. Conclusion	78
Objectifs du projet de thèse	81
Partie A : Développement de nouvelles méthodes de détection de l'ADN tumoral circulant par PCR digitale en gouttelettes	83
Chapitre A.I. Développement de tests de détection de l'ADNtc par PCR digitale en	
gouttelettes	85
A.I.1. Développement de tests pour la détection de mutations dans le cancer	
colorectal par PCR digitale en gouttelettes suite à une analyse NGS.	85
I. Introduction	85
II. Résultats	86
II.i. Criblage par qPCR des mutations impliquées dans la réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR	86
II.ii. Analyse par NGS des ADN extraits de tissus	87
II.iii. Développement de tests en technologie CAST [™] (Competitive Allele-Specific	; 。。
I aquian∞)	00 t
TaqMan®.	91
III. Conclusions	93
A.I.2. Résumé de l'article portant sur la détection multiplex de mutations rares par	
PCR digitale en gouttelettes	95
A.I.3. Article	99
A.I.4. Discussion de la partie A.I1	123
Chapitre A.II. Etude de l'intégrité de l'ADN tumoral circulant - Préambule1	126
A.II.1. Article en préparation1	128
A.II.2. Etude du lien entre le processus de mort cellulaire et la fragmentation de l'AD circulant1)N 54

A.II.3. Autre approche de l'évaluation du profil de distribution en taille de l'ADN utilisation d'un système miniaturisé de séparation de l'ADN (BIABooster, Picome France).	Itc : trics, 159
A.II.4. Discussion de la partie A.II.	166
Chapitre A.III. Vers un biomarqueur universel du cancer : étude de la méthylatio le cancer colorectal	<i>n dans</i> 174
A.III.1. Résumé de l'article	174
A.III.2. Article	177
A.III.3. Discussion de la partie A.III.	191
Partie B : Applications cliniques de la détection de l'ADN tumoral circulant des patients	au suiv i 194
Chapitre B.I. Etude PLACOL	195
B.I.1. Présentation de l'étude PLACOL	195
B.I.2. Article en préparation	197
<i>Chapitre B.II.</i> Enjeu de la détection de l'ADN tumotal circulant chez des patients de mélanome métastatique	<i>atteints</i> 219
B.II.1. Suivi des variations de l'ADNtc dans le cadre de l'étude de la résistance vémurafenib.) 219
B.II.2. Brève communication en préparation	223
B.II.3. Discussion de la Partie B	235
Conclusion générale	241
Perspectives	243
Annexe A. Informations supplémentaires du chapitre A.I.	245
I. Caractéristiques des sondes CAST™ testées en PCR digitales en gouttelettes	246
II. Résultats de PCR digitale en gouttelettes pour l'évaluation de 4 sondes CAST™ des mutations du gène KRAS	¹ ciblant 247
III. Résultats de PCR digitale en gouttelettes pour l'évaluation de 3 mutations diffé du gèneTP53 ou la mutation BRAF p.V600E.	rentes 248
IV. Comparaison des sondes CAST™ et TaqMan®	249
Annexe B. Suivi des variations de l'ADNtc chez 2 patients de la cohorte PLACOL	251
Annexe C. Article : "Plasmatic Circulating Tumor DNA in pancreatic cancer paties prognostic marker"	nts is a 253
Références	281

REMERCIEMENTS

Je remercie l'Ecole doctorale Frontières du Vivant, pour avoir sélectionné ce projet de thèse. L'école doctorale FDV diffuse les projets sélectionnés non financés à ses différents partenaires.

J'en viens ainsi à remercier la Fondation Servier, qui se positionne comme mécène en finançant les projets de doctorants FDV. La fondation Servier et principalement Emmanuel Canet, vice-président Recherche et Développement, de même qu'Olivier Nosjean, directeur de la plateforme de biotechnologie et principal interlocuteur, m'ont permis de concrétiser ce projet.

Valérie, je te remercie pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de ton équipe. Tu es très ouverte aux étudiants qui tentent leur chance et ne ferme aucune porte. Merci de m'avoir permis de partir en conférence, ces expériences m'ont beaucoup appris.

Pierre, je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du laboratoire MEPPOT, en particulier sur le projet PLACOL. Votre expérience et vos connaissances ont été déterminantes dans l'exploitation des résultats de cette étude clinique. Merci d'avoir pris le temps de travailler sur ce projet et de m'avoir permis de finaliser avec vous les analyses menant à ce joli travail.

Aziz, merci de m'avoir intégrée à l'étude clinique PLACOL, que tu as montée. Ce projet, central dans mon projet de thèse, m'a permis de travailler au plus proche des conditions cliniques et des patients, ce qui était une très forte motivation pour moi.

Je remercie les membres du jury pour leur participation à la soutenance de thèse et pour leur apport expérimenté sur le travail réalisé au cours de ce projet. Je remercie particulièrement les rapporteurs, Pr. Paul Hofman et Dr. François-Clément Bidard d'avoir accepté de relire et évaluer le manuscrit.

Philippe, tu es un pilier dans cette équipe ! Ton aide professionnelle est toujours associée à ta bienveillance envers les recrues. Merci d'avoir été là dans les différents moments de ma thèse et pour les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir.

Sonia, ton sens de l'organisation m'a aidée dans la planification de mes expériences. Tu as été ma voisine de bureau pendant une bonne partie de ma thèse, merci pour les petits fous rires et discussions (très) variées.

Karla, nous avons pu travailler ensemble sur au moins deux projets, et ta manière posée d'aborder les questions scientifiques m'a toujours beaucoup aidée. Ce fut de petites phrases, lancées en toute discrétion, qui m'ont guidée au cours de la thèse et permis d'avancer sur divers projets.

Eleonora, voisines de bureau et de manips, ta rigueur scientifique fut un très bon enseignement, de même que ta détermination. Tu as toujours tenu à finaliser les projets entrepris, ce qui est extrêmement agréable.

Ouriel, nos thèses se sont déroulées en parallèle, et bien que travaillant sur des sujets différents, nous avons pu avoir des discussions intéressantes sur divers sujets et notamment sur nos projets de carrière respectifs.

De façon générale, je remercie l'équipe TRAM, incluant les étudiants de passage en Master et autres personnes présentes à mon arrivée qui ont ensuite évolué vers d'autres voies.

Je remercie Audrey Didelot, pour sa réactivité dès lors qu'il fallait donner un coup d'accélérateur sur les expériences relatives au projet PLACOL.

Je remercie les membres du laboratoire MEPPOT, pour leur aide dans les diverses démarches que j'ai entreprises et pour leur accueil.

Je remercie Audrey Thomas, Benoît Blanchet, Nora Kramkimel et Nicolas Dupin pour leur aide au cours de notre collaboration sur le projet Mélanome.

Enfin, je remercie particulièrement ma famille, vous m'avez soutenue pendant ces trois années et avez été présents et compréhensifs, comme toujours. Fred je te remercie pour ton soutien rassurant sur cette dernière année.

Resume de These

La détection de l'ADN tumoral circulant (ADNtc), représente un biomarqueur d'intérêt en ce qu'il porte des altérations spécifiques de la tumeur des patients qui peuvent être détectable par un acte minimalement invasif permettant le suivi de l'évolution de la maladie. La détection de l'ADNtc requière une technique hautement sensible et quantitative pour le suivi de son évolution. Dans ce contexte, ce travail de thèse a porté sur la quantification et le suivi de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) par la PCR digitale en gouttelettes (PCRdg). Cet outil permet la détection d'altérations à l'échelle d'un ADN unique, offrant ainsi une sensibilité allant jusqu'à 0.001%.

Un premier aspect a porté sur le développement et l'optimisation des tests en PCRdg pour la détection et la quantification de mutations spécifiques du cancer colorectal pour le suivi de l'ADNtc. Ces tests ont été validés à la fois sur de l'ADN extrait de tissus tumoraux et plasmatiques. Les considérations relatives à la spécificité et à la sensibilité des tests utilisés ont été explorées.

Une autre partie a été consacrée à l'étude de l'intégrité de l'ADNtc. Un test de détection permettant de caractériser la distribution de taille de l'ADN circulant chez des patients a été développé en PCRdg. Nous avons observé que la fraction d'ADN tumoral circulerait sous forme de fragments plus courts chez des patients atteints de cancer que l'ADN circulant de sujets sains. De plus, une différence de taille a été observée entre l'ADN circulant muté et non muté chez les patients.

Dans le cadre de la recherche de tests simplifiant la détection de l'ADNtc, ciblant de nombreux patients et permettant une quantification précise, nous avons développé des tests de détection quantitative de l'hyperméthylation de gènes impliqués dans le CCR. Une forte corrélation entre les pourcentages d'ADN muté et d'ADN hyperméthylé a été observée au cours du suivi de patients. Ceci suggère la possibilité d'un suivi précis et quantitatif de l'ADNtc par l'évaluation de l'hyperméthylation en alternative à la détermination du statut mutationnel.

Une dernière partie de ce projet de thèse est consacrée à l'étude de l'impact clinique de la mesure de l'ADNtc.

L'étude PLACOL (PLAsma COLon), centrale dans ce projet de thèse, est pionnière dans l'évaluation de la valeur pronostique de l'ADNtc muté ou hyperméthylé. L'étude issue de ce projet a porté sur 82 patients inclus en ligne 1 ou 2 de traitement. La valeur pronostique de l'ADNtc, avant initiation du traitement, a été confirmée, en accord avec les données de la littérature. Au cours du suivi, Un seuil de « normalisation » de 0.1 ng/mL atteint au cours des 2 premiers prélèvements était facteur de bon pronostic. Un autre paramètre, la pente de décroissance de la concentration en ADNtc, s'est avéré déterminant dans l'évaluation du pronostic et de la réponse au traitement.

Une autre application de la détection de l'ADNtc par PCRdg est présentée dans le cadre d'une thérapie ciblée (anti BRAF mutée, vémurafenib) chez 11 patients atteints de mélanome. Une corrélation inverse entre les concentrations d'ADNtc et de vémurafenib a été démontrée, suggèrant l'intérêt du suivi de la bio-disponibilité des traitements ciblés et de l'ADNtc chez des patients atteints de cancer avancé, pour une précision de l'orientation thérapeutique.

LISTE DES ARTICLES SCIENTIFIQUES, PRESENTATIONS ET POSTER

Articles scientifiques

Plasmatic Circulating Tumor DNA in pancreatic cancer patients is a prognostic marker. Pietrasz D, Pécuchet N, <u>Garlan F</u>, Didelot A, Dubreuil O, Doat S, Imbert-Bismut F, Karoui M, Vaillant J-C, Taly V, Laurent-Puig P, Bachet J-B. En revision positive dans la revue Clinical Cancer Research *(présenté en Annexes du manuscrit)*

Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations. Zonta E, <u>Garlan F</u>, Pécuchet N, Perez-Toralla K, Caen O, Milbury C, Didelot A, Fabre E, Blons H, Laurent-Puig P and Taly V. PLOSOne, 2016, 11(7) (*présenté en Chapitre A.I.*)

Study of circulating tumor DNA hypermethylation as a universal biomarker of colorectal cancer. Garrigou S*, Perkins G*, <u>Garlan F</u>, Normand C, Didelot A, Le Corre D, Peyvandi S, Mulot C, Niarra R, Aucouturier P, Chatellier G, Nizard P, Perez-Toralla K, Zonta E, Charpy C, Pujals A, Barau C, Bouché O, Emile JF, Pezet D, Bibeau F, Hutchison JB, Link DR, Zaanan A, Laurent-Puig P, Sobhani I and Taly V. *Co-auteures. Clinical Chemistry, 2016, 62 (8) 1129-1139 (présenté en Chapitre A.III.)

Evaluation of circulating tumor DNA in advanced colorectal cancer patients' follow-up (PLAsma COLon study): quantification of mutated and hypermethylated circulating DNA using picoliter-droplet digital PCR. <u>Garlan F</u>, Laurent-Puig P, Siauve N, Didelot A, Perkins G, Blons H, Taieb J, Taly V and Zaanan A. A soumettre (présenté en Chapitre **B.I.**)

Study of the integrity of circulating tumor DNA: development of picoliter-droplet digital PCR assays dedicated to ctDNA quantification and characterization. <u>Garlan F</u>, Zonta E, Tavernier Q, Didelot A, Pecuchet N, Zaanan A, Laurent-Puig P, Taly V. A soumettre (*présenté en chapitre A.II.*)

Relationship between circulating tumor DNA and vemurafenib plasma concentrations in patients with advanced BRAF mutated melanoma. <u>Garlan F</u>, Blanchet B, Kramkimel N, Puszkiel A, Golmard JL, Noe G, Dupin N, Laurent-Puig P, Vidal M, Taly V and Thomas-Schoemann A. A soumettre (présenté en chapitre **B.II**.)

Droplet based digital PCR: application in cancer research. Perkins G, Lu H, <u>Garlan F</u> and Taly V. Advances in clinical chemistry, sous presse (*article de revue présenté en Annexes du manuscrit*)

Digital PCR compartmentalization I. Single-molecule detection of rare mutations. Perez-Toralla K, Pekin D, Bartolo JF, <u>Garlan F</u>, Nizard P, Laurent-Puig P, Baret J-C and Taly V. Medecine/Sciences (2015), 31(1):84-92 (*article de revue*)

Communications orales

The RainDrop dPCR system in a translational research environment: Methylation and Multiplexing on circulating tumour DNA. 4th qPCR & Digital PCR Congress, 20-21 Octobre 2016, Londres, Angleterre.

Droplet-based microfluidics to quantify circulating DNA in plasma of metastatic colorectal cancer patients. Nanobiotech Montreux, Novembre 2014, Montreux, Suisse

Droplet-based microfluidics for the highly sensitive and quantitative detection of cancer biomarkers. Centre Interdisciplinaires Chimie-Biologie -Paris, Université Paris Descartes, Septembre 2015, Paris, France.

<u>Poster</u>

Prognostic value of circulating tumor DNA in advanced colorectal cancer patients: quantification of hypermethylated or mutant sequences using picoliter-droplet digital PCR. <u>Garlan F</u>, Laurent-Puig P, Didelot A, Perkins G, Siauve N, Blons H, J. Taieb, V. Taly et Zaanan A.⁻ American Association for Cancer Research, Avril 2016, Nouvelle Orléans, Etats-Unis.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures présentées dans l'introduction

- Figure 1. Les différents types de biomarqueurs en oncologie.
- Figure 2. Représentation des biomarqueurs standards en oncolgie clinique.
- Figure 3. Stades de développement de la tumeur colorectale.
- Figure 4. Exemple de représentation du "cycle" de médecine personnalisée.
- <u>Figure 5.</u> Exemples de représentation de réarrangements chromosomiques et de leurs potentielles implications dans le développement du cancer.
- Figure 6. Altérations du niveau de méthylation du génome.
- Figure 7. Représentation schématique des étapes successives de la cancérogenèse colorectale décrite par Kinzler et Vogelstein en 1990.
- Figure 8. Capacités acquises par les cellules tumorales promouvant la prolifération incontrôlée et le développement de métastases.
- <u>Figure 9.</u> Implémentation de la représentation schématique des évènements de la tumorogenèse colorectale décrite par Fearon et Vogelstein en 1990.
- Figure 10. Voies de signalisation PIK3 et RAS activées par la protéine RAS mutée.
- **Figure 11.** Exemple de représentation de l'hétérogénéité clonale.
- Figure 12. Représentation des différents marqueurs circulants émergents qui peuvent être présents dans les biopsies liquides.
- Figure 13. Description du système de capture des cellules tumorales circulantes CellSearch®.
- **Figure 14.** Fréquence de détection d'ADNtc chez les patients dans quinze types de cancer différents.
- Figure 15. Libération par la tumeur d'ADN circulant dans les vaisseaux sanguins.
- Figure 16. Pourcentages (%) de méthylation détectés dans la tumeur (A) et sensibilités de détection clinique et analytique dans le plasma correspondant (B) de patients atteints de cancer colorectal d'après les travaux de Lee *et al.*, 2009.
- <u>Figure 17.</u> Représentation de l'influence du mécanisme de libération de l'ADN tumoral dans la circulation sanguine.
- **Figure 18.** Potentiel clinique de l'analyse de l'ADNtc.
- Figure 19. Enjeux clinique et quantitatif de la détection de l'ADN circulant.
- Figure 20. Représentation de la sensibilité des techniques de détection de l'ADN tumoral.
- **Figure 21.** Principe de la PCR digitale en comparaison à la qPCR classique.
- Figure 22. Systèmes de PCR digitale en micropuits ou microchambres.
- Figure 23. PCR digitale en emulsion basée sur l'utilisation de billes magnétiques.

- <u>Figure 24.</u> Techniques de production de l'émulsion acqueuse et polydispersité: impact sur la capacité d'encapsulation des molécules cibles en condition de dilution limite.
- Figure 25. Exemples de modules microfluidiques pour la manipulation des gouttes.
- **Figure 26.** Shéma de production de gouttes par microfluidique pour la réalisation d'une réaction de dPCR en gouttelettes.
- **Figure 27.** Système de microfluidique de gouttes pour la réalisation d'une dPCR décrit par Pekin *et al.* Lab On Chip, 2012.
- <u>Figure 28.</u> Description des étapes d'analyse du système de PCR digitale en gouttelettes commercialisé par Raindance TechnologiesTM.
- <u>Figure 29.</u> Description des étapes d'analyse du système de PCR digitale en gouttelettes commercialisé par Raindance Technologies.
- Figure 30. Description des étapes d'analyse du système commercialisé par STILLA Technologies.
- <u>Figure 31.</u> Détection multiplex par le couplage de la microfluidique de gouttes et de sondes de détection par fluorescence de l'ADN.
- Figure 32. Détection multiplex en PCR digitale en gouttelettes utilisant un intercalant fluorescent de l'ADN.
- **Figure 33.** Exemple de détermination des populations positives pour la mutation EGFR p.L858R par l'analyse de PCR digitale en gouttelettes.
- Figure 34. Evaluation des performances analytiques du système CAPP-Seq (Dressman et al.).
- <u>Figure 35.</u> Etape de préparation d'une librairie de séquençage par enrichissement ciblé via la PCR digitale en gouttelettes.
- Figure 36. Représentation de la stratégie couplant le NGS pour la caractérisation de l'ADN tumoral issu de la biopsie et la PCR digitale en gouttelettes pour l'analyse en série d'échantillons d'ADNtc pour le suivi des patients.

Figures présentées en A.I.

- Figure 37. Test du profil mutationnel des tissus tumoraux (biopsie ou pièce opératoire) par sondes TaqMan® ciblant les 7 mutations les plus fréquentes du gène KRAS et la mutation BRAF p.V600E.
- Figure 38. Illustrations de suivis des variations de l'ADNtc (%, courbe bleue) et représentation des données cliniques associées au patient.
- Figure 39. Distribution des mutations au sein de la cohorte d'étude, complétion du panel de mutations par les résultats de séquençage.
- Figure 40. Principe de fonctionnement des sondes de détection TaqMan® et CAST[™].
- <u>Figure 41.</u> Test des sondes CAST[™] ciblant la référence non mutée (ADNg, contrôle négatif) et l'ADN portant la mutation KRAS p.Q61K par des dilutions de l'ADN de tumeur.
- <u>Figure 42.</u> Suivi des variations d'ADNtc chez 2 patients dont la tumeur présente une mutation *TP53*.
- <u>Figure 43.</u> Graphiques représentant le nombre de faux positifs obtenus selon la quantité d'ADN génomique testée pour les sondes CAST[™] ou TaqMan®.

- <u>Figure 44.</u> Comparaison des tests d'ADN de tissu tumoral en sondes (A) TaqMan® et (B) CASTTM ciblant la mutation TP53 p.R175H.
- Figure 45. Graphique représentant la quantité de gouttelettes faux positifs et de "bruit" observées dans le cas des sondes CAST[™].

Figures présentées en A.II.

- Figure 46. Test de viabilité des cellules LOVO et H1975 : vérification de l'induction de l'apoptose et de la nécrose.
- <u>Figure 47.</u> DII obtenus par les analyses en PCR digitale en gouttelettes des ADN de cellules ou de surnageant issus de la culture des lignées (A) LOVO ou (B) H1975.
- Figure 48. Technologie BIABooster développée par la société Picometrics sur la base du système décrit par Bancaud et al.
- Figure 49. Résultats de l'analyse par le système Caliper de l'ADN plasmatique de patients atteints (A) de cancer du poumon métastatique (CPm) ou (B) de cancer colorectal métastatique (CCRm).
- Figure 50. Exemples de profils de distribution en taille des ADN circulants de patients (A, CCRm ; B, CPm) et de sujets sains (C), mesurés par le système BIABooster.
- Figure 51. Analyse par le système BIABooster des profils de distribution observés par le système BIAB en taille des ADN circulants de patients CCRm (A), CPm (B) et d'un sujet sain (C).
- Figure 52. DII obtenus d'après les résultats d'analyse par BIABooster des échantillons d'ADN plasmatique de patients atteints de cancer du poumon métastatique (CPm, N=9) ou de cancer colorectal métastatique (CCRm, N=8), et de sujets sains (N=15).
- Figure 53. Comparaison des résultats obtenus par PCR digitale en gouttelettes et par le système BIABooster.
- <u>Figure 54.</u> Profil de distribution en taille de l'ADNtc observé chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire par Jiang *et al.*, 2015.
- Figure 55. Profils de distribution en taille de l'ADN de patients atteints de cancer du poumon (A) ou de mélanome (B) déterminés par l'analyse en séquençage paired-end dans l'étude de Underhill *et al.*, 2016.

Figures présentées en A.II.

• Figure 56. Conception de l'étude clinique PLACOL.

Figures présentées en Annexe A.I.

- Figure 57. Graphiques de résultats de PCR digitale en gouttelettes combinée aux sondes ciblant des mutations de KRAS.
- Figure 58. Graphiques de résultats de PCR digitale en gouttelettes combinée aux sondes ciblant des mutations de *TP53* ou *BRAF*.
- Figure 59. Graphiques de PCR digitale en gouttelettes pour la comparaison des sondes (A) TaqMan® et (B) CAST[™] ciblant la mutation TP53 R248Q (population sur l'axe x) et la référence TP53 (wild-type (WT), population sur l'axe Y, fluorescence VIC).

Figures présentées en Annexes B.

- <u>Figure 60.</u> Représentation des variations d'ADNtc (ligne bleue, %) et de l'évaluation clinique (somme des lésions, barres noires) au cours du suivi du patient A.
- <u>Figure 61.</u> Représentation des variations d'ADNtc (ligne bleue, %) et de l'évaluation clinique (somme des lésions, barres noires) au cours du suivi du patient B.

Tableaux présentés en Introduction

- <u>Tableau 1.</u> Classification TNM pour le cancer colorectal d'après la dernière édition AJCC (7ème édition).
- <u>**Tableau 2.**</u> Comparaison des capacités d'analyses offertes par les biomarqueurs circulants: CTC, exosomes et ADNtc.
- <u>**Tableau 3.**</u> Comparatif des technologies de PCR digitale en gouttelettes commercialisées par Bio-Rad, Raindance Technologies, et STILLA Technologies.
- <u>**Tableau 4.**</u> Comparaison des techniques de Next-Generation Sequencing et PCR digitale en gouttelettes.

Tableaux présentés en A.I.

- <u>Tableau 5.</u> Exemple de résultat de séquençage de tumeur de patients (référence colonne de gauche) et disponibilité de tests CAST[™], en vue du développement de tests en PCR digitale en gouttelettes.
- <u>Tableau 6.</u> Caractéristiques des sondes CAST[™] testées en PCR digitales en gouttelettes. Ces sondes ont été testées en sensibilité et spécificité (dilutions et test sur ADN de contrôle négatif (ADNg)).

Tableaux présentés en A.II.

- <u>Tableau 7.</u> DII obtenus pour les ADN de cellules LOVO (A) et H1975 (B), dans les conditions appliquées pour le test : contrôle (pas de traitement), DMSO (1μM), induction de l'apoptose (staurosporine, 1μM) ou de la nécrose (choc thermique, 56°c).
- <u>Tableau 8.</u> Résultats d'analyse des profils d'ADN circulant plasmatique de patients CCRm, CPm et de sujets sains mesurés par la technologie BIABooster. Les 1er (75-20pb) et 2ème pics (240-370 pb) de taille d'ADN observés sont indiqués, ainsi que les proportions de ces pics en comparaison aux 4 pics mesurés.

Tableau présenté en Annexe

 <u>Tableau 6.</u> Caractéristiques des sondes CAST[™] testées en PCR digitales en gouttelettes. (Annexe A.I)

ABREVIATIONS

<u>Générales :</u>

- ACE : Antigène Carcino-Embryonnaire
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- ADNtc : ADN tumoral circulant
- ADNIc : ADN libre circulant
- ARN : Acide Ribonucléique
- BEAMing : Beads Emulsion Amplification and Magnetics
- CA125 : Carbohydrate Antigen 125
- CA15-3 : Cancer Antigen 15-3
- CA19-9 : Carbohydrate Antigen 19-9
- CAST : Competitive Allele Specific TaqMan
- · CCR : Cancer Colorectal
- · CCRm : cancer colorectal métastatique
- CTC : cellules tumorales circulantes
- DII : DNA Integrity Index
- dPCR : PCR digitale
- ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status
- EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
- ePCR: PCR en emulsion
- FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
- IncRNA/ IncARN: long non coding RNA
- · LOH: Loss of Heterozigosity
- · MIQE : Minimal Information for Quantitative Experiments
- MMR: MisMatch Repair
- MT: mutant
- miARNs : micro-ARN
- MSI : Microsatellite Instability
- NGS : Next-Generation Sequencing
- pb : Paire de Bases
- PCRdg : PCR digitale en gouttelettes
- PSA: Prostate Specific Antigen
- RECIST: Response Evaluation In Solid Tumors
- ShRNA/shARN: short hairpin RNA
- SNP: Single Nucleotide Polymorphism
- · Q-PCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction
- TNM: Tumor Nodes Metastasis
- WT: Wild Type

Gènes et protéines

- APC: Adenomatous polyposis coli
- BCR-ABL: Breakpoint Cluster Region-Abelson
- BRCA1/2: Breast Cancer 1/2
- CTNNB1: Catenin Beta 1
- EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
- · KRAS: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
- MLH: MutL Homolog
- NPY: Neuropeptide Y
- PENK: proenkephalin
- PTEN: Phosphatase TENsin homolog
- · SMAD: (contraction de) Sma (et) Mad: Mothers against decapentaplegic
- TP53: Tumor Protein P53
- TGF β : Transforming Growth Factor β
- · VEGF: Vascular endothelial growth factor
- WIF1: Wnt Inhibitory Factor 1
- WNT: Wingless Integration site

INTRODUCTION

Le cancer est une maladie génétique dont les caractéristiques sont propres à chaque type de tumeur. Des stratégies reposent sur la recherche de biomarqueurs pour le diagnostic, l'orientation thérapeutique, le suivi de l'efficacité du traitement, la détection de progression ou de récidive potentielles.

De récentes avancées ont eu lieu avec le développement de la « médecine personnalisée » et dans le même temps, l'émergence de techniques de détection hautement sensibles. Celles-ci permettent, entre autres, de déterminer le profil moléculaire de l'ADN de tissu tumoral, afin d'orienter le choix du traitement au moment du diagnostic.

Ce projet de thèse est centré sur la mise en place de stratégies de détection de l'ADN tumoral circulant (ADNtc), reflet du génome tumoral, afin d'évaluer son potentiel clinique pour le suivi des patients. Nous nous intéresserons à la détection de biomarqueurs du cancer et aux outils actuels utilisés en clinique. Ainsi l'apport de l'identification d'altérations présentes dans la tumeur, détectées à partir de biopsies, sera évoqué. Les marqueurs émergents basés sur l'utilisation de biopsies dites liquides seront décrits, étant donné leur potentiel comme complément voire alternative aux actes invasifs que représentent les biopsies classiques. Enfin, les enjeux relatifs à la détection de l'ADNtc seront décrites.

I. Les biomarqueurs du cancer

I.i. Utilité clinique des biomarqueurs

Par définition, les biomarqueurs sont des paramètres biologiques mesurables et quantifiables, reflétant un état patho-physiologique. Il peut s'agir de la taille des lésions obtenue par imagerie, de certaines protéines et hormones, ou encore d'altérations moléculaires spécifiques de la tumeur. Il existe différents types de biomarqueurs dans le cancer. Ils sont divisés en trois grandes classes, et peuvent être pronostiques, diagnostiques, ou prédictifs (**Figure 1**).



Figure 1. Les différents types de biomarqueurs en oncologie. Ils permettent le diagnostic du cancer, l'évaluation du pronostic ou encore visent à prédire l'efficacité du traitement choisi. Dans le cas d'outils diagnostics, l'objectif est de préciser le type de cancer, sa localisation. Les marqueurs pronostiques permettent d'évaluer l'agressivité du cancer, de détecter une progression de la maladie. Enfin les marqueurs prédictifs aident au choix du traitement afin d'optimiser le bénéfice thérapeutique. Adapté de Sawyers et al.¹.

Un marqueur diagnostique devrait permettre de distinguer clairement un cancer d'une maladie bénigne et de déterminer le type de cancer en question². Il devrait par définition être présent de façon précoce dans le développement du cancer afin de maximiser les chances de guérison.

Un marqueur pronostique permet de déterminer l'avancement de la maladie, et distinguer s'il s'agit d'un cancer ayant de bonnes chances d'être guéri ou au contraire si son état d'avancement réduit les chances de guérison. Un tel marqueur peut aider à guider le traitement afin de peser le rapport bénéfice/risque de thérapies³. Les traitements peuvent en effet générer une toxicité plus ou moins tolérable, notamment chez les patients dont la maladie présente de nombreux signes cliniques. Des études évaluent l'efficacité et les risques associés aux traitements, comme récemment dans le cas de la thérapie ciblée anti-angiogéniques (anti-VEGF par exemple), associée aux chimiothérapies combinant 2 ou 3 agents chez des patients atteints de cancer colorectal avancé⁴.

Un marqueur prédictif ou d'orientation thérapeutique, devrait permettre de choisir le traitement le plus adapté à chaque patient. La plupart des traitements anti-cancéreux reposent sur les agents cytotoxiques qui tuent les cellules en prolifération. Ils génèrent une forte toxicité et ont une efficacité variable³. La combinaison de tels agents à des traitements dits « ciblés » permet d'optimiser l'efficacité thérapeutique⁵. Cependant, l'émergence de résistance à ces traitements a donné lieu à une précision du panel de patients pouvant en bénéficier^{6,7}.

I.i. Les biomarqueurs en pratique clinique

Les biomarqueurs du cancer, validés pour une utilisation en routine clinique, reposent principalement sur l'imagerie, le dosage de protéines spécifiques, et les biopsies, qui permettent de tester les tissus de tumeur pour la présence d'altérations génétiques spécifiques du type de cancer (**Figure 2**).



Figure 2. Représentation des biomarqueurs standards en oncolgie clinique. Selon l'échelle d'observation (en nombre de cellules considérées) il existe diférents outils cliniques. Les marqueurs en pratique clinique reposent sur l'imagerie (évaluation des critères RECIST), le dosage de marqueurs (antigènes, hormones, enzymes) et sur les examens histologiques (analyses de tissus) et moléculaires (détermination d'altérations génétiques). Adapté de http://www.arcs.asso.fr.

Au moment du diagnostic, plusieurs examens sont réalisés afin de préciser celui-ci et de décider du traitement au cours du suivi ainsi qu'évaluer le pronostic.

Des dosages d'antigènes, tels que l'ACE (antigène carcino-embryonnaire) dans le cancer colorectal⁸, le CA15-3 (Cancer Antigen 15-3) dans le cancer du sein, l'antigène CA125 (Carbohydrate

Antigen 125) dans le cancer de l'ovaire⁹ et le PSA (Prostate Specific Antigen) dans le cancer de la prostate, sont réalisés dans le sang afin de confirmer les manifestations cliniques. Ces protéines sont produites principalement par les cellules cancéreuses.

Des protéines ou hormones sont aussi utilisés, selon le type de cancer. Notamment, le dosage de la calcitonine est utilisé pour la détection précoce des cancers médullaires de la thyroïde dans les familles à risque. Les dosages de l'hCG (hormone chorionique gonadotrope) et de sa sous-unité β -hCG, de l'AFP (alphafoetoprotéine) et de la LDH (protéine lactate déshydrogénase) permettent d'aider au diagnostic du cancer du testicule¹⁰.

Récemment, une autorisation de mise sur le marché (AMM) a été délivrée pour recourir à un test ciblant une altération génétique dans le sang de patients atteints de cancer du poumon. Ce test est administrable à la discrétion du médecin, qui souhaiterait avoir connaissance de la présence d'une mutation du gène *EGFR* dites « de sensibilité » à un inhibiteur de tyrosine kinase (erlotinib) avant la prise de décision thérapeutique¹¹. Cette avancée est pionnière par le ciblage de mutation dans les marqueurs circulants, en complément ou en alternative au test de l'ADN de tissu tumoral.

D'autres examens, radiologiques, tels que la radiographie, le scanner, la résonance magnétique nucléaire, le TEP-scan ou encore des échographies, viennent confirmer le diagnostic et préciser la localisation de la tumeur primaire et d'éventuelles métastases. La taille de la tumeur et/ou des métastases peut être évaluée permettant de déterminer une somme de la taille des lésions, qui pourra être comparée à différents temps. Des critères d'évaluation tumorale, appelés RECIST ¹² pour « Reponse Evaluation Criteria In Solid Tumors », ont été définis afin de de déterminer l'évolution du cancer. On parle de maladie en progression lorsqu'une augmentation plus de 20% de la somme des tailles des lésions est observée, de maladie stable si la variation de la somme des tailles des lésions reste comprise entre -30% et +20%¹², et de réponse partielle ou complète en cas de diminution de plus de 30% ou de 100% de diminution de la somme des tailles des lésions respectivement.

Des examens anatomopathologiques peuvent être réalisés à différents moments : au diagnostic, au cours du traitement, ou après chirurgie dans le cas d'exérèse de la tumeur. C'est l'examen anatomopathologique qui permet d'établir de façon définitive le diagnostic de cancer, on parle de preuve histologique. Il consiste à analyser au microscope des cellules ou des tissus prélevés sur l'organe identifié comme présentant une tumeur. Avant traitement, il s'agit de confirmer le diagnostic, mais aussi de préciser le type de cancer et de déterminer le niveau d'invasion des tissus par les cellules cancéreuses. Cela donne une première indication sur l'étendue de la maladie et contribue à définir le stade du cancer. Le type et le stade du cancer constituent des critères pronostiques.

Un système appelé TNM pour Tumor Nodes Metastasis a été instauré par un chirurgien français, Pierre Denoix, dans les années 1940¹³. Il vise à évaluer la sévérité du cancer par la détermination de l'invasion cellulaire dans les tissus (Figure 3). A noter qu'un système antérieur à la classification TNM avait été proposé, la classification de Dukes, puis un dérivé de celle-ci appelé Astler-Coller, mais ces systèmes sont désormais moins utilisés voire abandonnés¹⁴. Le système TNM revient à évaluer si les cellules cancéreuses sont localisées au site tumoral primaire (T), ont envahi

les ganglions lymphatiques (N), ont été disséminées dans la circulation sanguine et ont abouti à la formation de métastase (M).

Selon cette évaluation, un stade d'avancement du cancer est établi¹⁵ (Tableau 1) :

- Stade 0 : carcinome *in situ* (Tis). La tumeur est très superficielle et n'envahit pas la sousmuqueuse, les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints et qu'il n'y a pas de métastase à distance ;
- Stades I/II/III : plus la taille de la tumeur est importante (T1 à T4) (Figure 3), plus le stade est élevé et/ou les cellules cancéreuses ont envahi les ganglions lymphatiques (N0 à N2), ou un ou plusieurs organe(s) adjacent(s) ;
- Stade IV : les cellules tumorales ont migré à distance du site primaire ou d'organes adjacents par la présence de métastases (M).

Une sous classification au sein des T, N et M en a, b et c, permet de préciser l'invasion de la tumeur (à la surface (a) ou plus profondément dans les tissus (b)), de distinguer le nombre de ganglions envahis (un (a) ou plus (b), invasif (c)) et le nombre d'organes distants dans lesquels la présence de cellules cancéreuses a été détectée (un (a) ou plus (b)).

Stades	т	N	М
0	T0,Tis	NO	MO
1A	T1	NO	MO
1B	T2	NO	MO
2A	Т3	NO	MO
2B/C	T4	NO	MO
ЗA	T1-2	N1/2	MO
3B	T1-4	N1/2	MO
3C	T3-4	N1/2	MO
4A/B	Tout T	Tout N	M1
*Tis	Carcinome in situ		

Tableau 1. Classification TNM pour le cancer colorectal d'après la dernière édition AJCC (7ème édition). Des sous-classes a/b/c, non précisées ici, se réfèrent à l'invasion de la tumeur (a : non invasive, b : invasion et éventuelle extension à des organes adjacents), au nombre de ganglions lymphatiques envahis (a: 1 ; b: 2-3 ; c: dépôts tumoraux invasifs), et d'organes distants touchés par la présence de métastase(s) (a: 1 ; b : >1). Adapté du site de l'AJCC¹⁶.

Selon le type de cancer, une classification TNM peut donner lieu à un stade différent et peut être corrigée en fonction des recherches et observations cliniques^{17,18}. Il existe différents systèmes de classification selon le type de cancer, et notamment dans le cancer colorectal. Cependant, ils sont proches et reposent sur l'estimation de l'invasion du tissu colique et des ganglions lymphatiques. Dans la septième édition de la classification TNM par l'American Joint Committee for Cancer (AJCC)¹⁶, le système TNM du cancer colorectal est défini tel que reproduit dans le **Tableau 1** représenté ci-dessus. La classification TNM est la base pour une définition des stades au plus proche de la réalité clinique et est déterminante pour la décision thérapeutique, qui sera adaptée à l'agressivité de la tumeur.



Figure 3. Stades de développement de la tumeur colorectale. Tis, la tumeur est non invasive, T1 à T4: la tumeur traverses les différentes couches tissulaires avec en T3 un envahissement des ganglions lymphatiques et en T4, une dissémination des cellules tumorales à distance du site d'origine¹⁷.

L'analyse des tissus permet en outre de préciser les caractéristiques des cellules, comme par exemple le statut HER2, d'intérêt dans l'orientation thérapeutique de patientes atteintes de cancer du sein. Il est évalué par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence¹⁹ pour déterminer le nombre de copies du gène *HER2*, ou par immunofluorescence afin d'évaluer la quantité de protéines HER2 dans les cellules cancéreuses. Une analyse moléculaire permet de détecter les mutations du gène *HER2*, dont la présence est testée dans le cancer du sein aussi pour le choix du traitement. De la même façon, les mutations du gène *KRAS*, prédictives de résistance aux traitements anti-EGFR⁶ sont testées au diagnostic du cancer colorectal. Ces altérations tumorales sont de potentiels marqueurs diagnostiques, prédictifs de réponse aux traitements ou pronostiques du cancer. Identifier les altérations présentes dans les tumeurs est devenu un enjeu de la médecine personnalisée, permettant d'adapter le traitement au profil génétique du patient, comme cela est représenté dans la **Figure 4**, qui illustre le cycle de médecine personnalisée.



Figure 4. Exemple de représentation du "cycle" de médecine personnalisée. Au moment du diagnostic, la meilleure orientation thérapeutique doit être déterminée. Une analyse génomique des échantillons de biopsie permet l'identification de potentielles altérations génétiques qui pourraient être des biomarqueurs pour le choix du traitement. Le traitement « personnalisé » des patients peut ainsi devenir possible en regard de leur profil génétique. Adapté de McConaill et al.²⁰

I.ii. Altérations spécifiques du génome tumoral

I.ii.1. Réarrangements génomiques

Au cours des divisions cellulaires, lorsque des gènes de réparation de l'ADN sont dérégulés, d'importants réarrangements du génome peuvent se produire, menant à des aberrations chromosomiques retrouvées dans le génome tumoral²¹ (**Figure 5**).



Figure 5. Exemples de représentation de réarrangements chromosomiques et de leurs potentielles implications dans le développement du cancer. Des zones chromosomiques peuvent être dupliquées, inversées ou encore supprimées au cours de réarrangements risquant d'impliquer des variations du nombre de copies de gènes, la perte de l'expression de gènes régulateurs ou encore la perte de séquences régulatrices, respectivement. Les insertions de zones d'un chromosome dans un second peuvent donner lieu à l'ajout de séquences oncogéniques²¹.

Des segments chromosomiques sont insérés ou supprimés lors de ces réarrangements²². Certaines séquences peuvent alors être amplifiées conduisant à la multiplication parfois considérable du nombre de copies d'un gène. Des cas de translocations chromosomiques, dues à une recombinaison inégale

entre séquences homologues dans deux chromosomes différents, s'observent également dans les cancers, particulièrement dans les leucémies^{23,24}. L'instabilité chromosomique est un mécanisme radical lorsqu'il engendre la perte de gènes suppresseur de tumeur (*TP53*, *APC* ou *SMAD4*)²⁵.

I.ii.2. Les altérations ponctuelles

Ces altérations peuvent résulter d'erreurs survenues au cours de la réplication de l'ADN ou de l'influence d'agents mutagènes qui peuvent aboutir à la modification d'une base. Les mutations correspondent au remplacement d'un nucléotide par un autre (mutation par substitution), à la perte d'un nucléotide (délétion) ou à l'addition d'un nucléotide (insertion). Selon le type d'altération, lorsque la séquence codante du gène est modifiée, la protéine issue du gène muté peut présenter une anomalie structurale la rendant instable, non fonctionnelle ou modifiant son activité (suractivité, protéine inactive).

On distingue :

- les mutations silencieuses, aucun changement protéique ne se produit ;

- les mutations faux-sens, le changement de base a lieu dans une séquence codante et entraîne un changement d'acide aminé dans la chaîne protéique ;

 les mutations non-sens, la substitution a lieu dans une séquence codante qui conduit à une protéine tronquée par la survenue d'un codon stop anormal. La protéine correspondante est alors dégradée ;

- les insertions et délétions modifient le cadre de lecture et cela induit généralement la production de protéines tronquées ou aberrantes.

I.ii.3. Les polymorphismes génétiques

Ils sont souvent plus fréquents dans les séquences introniques que dans les exons. Les variations phénotypiques peuvent aller jusqu'à la prédisposition à certaines maladies ou la sensibilité à certains médicaments d'où l'intérêt pour la prise en charge thérapeutique des patients ²⁶. Plusieurs types de polymorphismes sont observés, on distingue :

- les « Single nucleotide polymorphisms » (SNP), qui n'atteignent qu'un nucléotide par substitution, insertion ou délétion. Ainsi, les mutations par substitution et SNP sont identiques d'un point de vue biochimique. Cependant, les mutations correspondent à des événements rares (moins de 1%) et délétères, tandis que les polymorphismes sont des événements fréquents et non délétères, responsable de la différence inter-individuelle ;
- les polymorphismes du nombre de répétitions de séquences micro- ou mini- satellitaires, comme décrit plus haut, « Variable number of tandem repeats » (VNTR) ;
- des variations du nombre de copies de certains gènes appelés Copy number variations(CNV), influençant le niveau d'expression des gènes²⁷.

I.ii.4. Les altérations épigénétiques

Des remaniements épigénétiques se produisent dans le génome, pouvant modifier l'expression des gènes. Le mode principal de régulation épigénétique est la méthylation de l'ADN par ajout d'un groupement méthyl sur les cytosines de la région promotrice, réalisée par des ADN

méthyltransférases. L'enzyme DNMT1 (DNA methyltransferase) joue un rôle « de maintenance » de l'expression des gènes. La déméthylation des promoteurs du gène LINE1, séquence répétitive dérivée du gène d'une rétrotranscriptase, non exprimée dans les tissus normaux^{28–30} résulte en une instabilité génomique favorisant l'oncogenèse.

Les génomes de tumeurs présentent un niveau de méthylation global en moyenne plus faible que celui de génomes normaux ^{31,32} (**Figure 6**). En revanche, c'est bien une hyperméthylation de promoteurs de gènes rôle suppresseur de tumeur³³ qui aboutit à la diminution voire l'extinction de leur expression et par suite, au processus d'oncogenèse.



Figure 6. Altérations du niveau de méthylation du génome. Le génome tumoral est globalement moins méthylé que le génome non tumoral. Plus spécifiquement, il se produit une hyperméthylation des séquences promotrices de gènes de régulation, en particulier les gènes suppresseurs de tumeur. Tandis qu'une instabilité génomique est engendrée par l'hypométhylation de régions normalement hyperméthylées (telles que LINE1). Ces évènements participent au développement du cancer. Issu de Robertson et al³⁴.

I.iii. Mécanismes moléculaires du cancer colorectal

I.iii.1. Des évènements génétiques reflétant la pathologie

La tumorigenèse du cancer colorectal a été décrite en 1990 par Vogelstein et Fearon³⁵ (**Figure 7**) comme un processus séquentiel, comprenant plusieurs étapes entre la transformation d'un adénome en un carcinome : la muqueuse colique normale évolue vers la formation d'un polype adénomateux non dysplasique puis dysplasique avec l'apparition de foyers cryptiques aberrants, suivi de l'apparition d'un carcinome *in situ*, puis d'un carcinome invasif, suivie de la formation de métastases³⁵. Des altérations génétiques concomitantes à ces étapes ont été mises en évidence, combinant la perte de matériel génétique par réarrangement génomique et l'occurrence de mutations d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeur³⁶.

Ces évènements génétiques particuliers ont été reliés à plusieurs voies de signalisation suggérant l'existence de différentes voies de carcinogenèse du cancer colorectal. L'accumulation d'altérations génétiques semble être un facteur promoteur de la malignité des tumeurs : des événements provoquent une inhibition de l'apoptose, d'autres, plus tardifs, favorisent l'angiogenèse et la motilité des cellules, par exemple.



Figure 7. Représentation schématique des étapes successives de la cancérogenèse colorectale décrite par Kinzler et Vogelstein en 1990. Le passage d'un épithélium normal à la formation d'un carcinome puis de métastases est lié aux évènements génétiques: mutations de gènes « drivers » tels qu'APC, KRAS, et aux réarrangements chromosomiques. Modifié de Fearon et Vogelstein³⁶.

Certains évènements génétiques peuvent être précurseurs du passage d'une tumeur maligne à un stade métastatique. Ainsi, pouvoir détecter précocement les altérations se produisant dès les premières étapes de la cancérogenèse permettrait la mise en place de biomarqueurs diagnostics. De même que le suivi des altérations permettrait d'affiner le pronostic et déterminer l'état d'avancement du cancer, ou encore anticiper la survenue d'évènements génétiques pathogènes par la mise en place de thérapies ciblées pouvant potentiellement stopper ou ralentir le développement de la maladie.

Plus tard, Hanahan s'est intéressé aux altérations dans leur globalité afin d'en tirer une classification générale des processus amenant au développement d'un cancer³⁷.

I.iii.2. Vers une vision globale des facteurs favorisant la cancérogenèse

Un grand nombre d'altérations ont été mises en évidence à ce jour, et leur combinaison résulte en de multiples possibilités de développement du cancer. Hanahan et Weinberg^{37,38} ont mis en évidence les capacités acquises par les cellules aboutissant à une prolifération aberrante caractéristique du cancer: l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance, l'inhibition de la mort cellulaire par apoptose, la prolifération infinie, la favorisation de l'angiogenèse, l'invasion des tissus ou encore la capacité métastatique (**Figure 8**). L'instabilité génique et génomique est une capacité supplémentaire favorisant l'acquisition des précédentes. Les cellules tumorales développent des stratégies d'échappement à la réponse immunitaire³⁹.



Figure 8. Capacités acquises par les cellules tumorales promouvant la prolifération incontrôlée et le développement de métastases. Adapation de Hallmarks of cancer: the next generation, Cell, 2010.

I.iii.3. Classification moderne du cancer colorectal : altérations génétiques et profils moléculaires.

D'un point de vue histologique, le cancer colorectal représente 90% d'adénocarcinomes résultant de l'évolution en tumeur maligne d'un polype adénomateux. D'un point de vue moléculaire, des instabilités génomiques dues à des réarrangements moléculaires ont été identifiées et bien caractérisées dans le cancer colorectal, avec l'existence notamment d'instabilités chromosomiques, génétiques, ou encore de modifications épigénétiques (méthylations aberrantes)⁴⁰. La vision séquentielle de la tumorigenèse décrite par Fearon et Vogelstein en 1990 (voir **Figure 6**) a été complétée par la compréhension de mécanismes qui prennent en compte le rôle de la matrice extracellulaire, du métabolisme des cellules, ou encore de processus liés au système l'immunitaire⁴¹. Un consensus en 4 sous-types moléculaires avait récemment été établi à partir de 6 systèmes de classification déterminé par des groupes d'experts du CCR⁴². Dernièrement, ce consensus a évolué avec l'addition de 2 sous-groupes, prenant en compte l'influence du stroma et du rôle de l'immunité^{43,44}. Nous ne discuterons pas ici les considérations relatives au microenvironnement tumoral, et nous concentrerons sur les profils d'altérations génétiques du CCR.

I.iii.3.a. L'instabilité chromosomique

Dans le cas d'instabilité chromosomique, on parle de phénotype moléculaire LOH+ (loss of heterozigosity) qui concerne 80 à 85% des cas sporadiques de cancer colorectal. L'instabilité chromosomique résulte en :

- l'inactivation de gènes de régulation de la mitose et/ou de gènes de réparation de l'ADN, un nombre anormal de centrosomes ou encore une érosion des télomères ;
- la perte de bras chromosomiques porteur d'une copie normale de gènes suppresseurs de tumeurs *TP53* (17p), *APC* (5q) et *SMAD2/4* (18q)^{45,46}.

I.iii.3.b. L'instabilité génétique

Il existe des défauts de réparation de mésappariement de l'ADN (DNA mismatch repair, MMR). La persistance de mutations dues au MMR dans les régions microsatellitaires induit un phénotype appelé instabilité microsatellite (MSI+)⁴⁷. Ces MMR peuvent être :

- héréditaires dans les cas du syndrome de Lynch (hereditary non polyposis colorectal cancer, HNPCC) avec la perte de fonction des gènes MLH1, MSH2, MSH6, PMS2.

- acquises avec une inactivation d'un gène de réparation de l'ADN dans environ 15 à 20 % des cas sporadiques (non apparentés au syndrome de Lynch). Cette inactivation est souvent due à l'hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1*.

Si les instabilités microsattelitaires sont situées dans les exons de gènes de régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose ou encore de facteurs de transcription tels que *TGF* β *R2*, *IGF2R*, *PTEN*, *MSH3* et *MSH6*, alors une accumulation de mutations se produit, et le décalage de cadre de lecture induit une inactivation des protéines⁴⁰.

I.iii.3.c. Les modifications épigénétiques

Les variations épigénétiques peuvent induire une modification de l'expression des gènes. Dans le cancer colorectal, on parle de phénotype méthylateur appelé CIMP+ pour *CpG island methylation phenotype*. Les îlots CpG qui sont des régions riches en dinucléotides CpG sont présents dans la région 5' d'environ 60 % des gènes et normalement maintenus dans un état moins méthylé que l'ensemble du génome en moyenne, ce qui permet l'engagement de la transcription des séquences promotrices des gènes. L'hyperméthylation aberrante des ilots CpG de régions promotrices des gènes, notamment du gène *MLH1*, a été démontrée⁴⁸.

Plusieurs gènes suppresseurs de tumeur peuvent être inactivés par une désacétylation des histones entraînant une condensation de la chromatine qui empêche l'accès des facteurs transcriptionnels à l'ADN ainsi compacté. Ceci résulte du transfert d'un groupe méthyle (-CH3) de la S-adénosylméthionine sur des résidus cytosines en position C5, catalysé par les enzymes ADN méthyltransférases. Ainsi, des gènes impliqués dans l'apoptose, l'adhésion cellulaire, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la transduction du signal et la structure de la chromatine peuvent être inactivés : *MGMT*, *CDKN2A/p16INKa*, *CDKN2A/p14ARF*, *RUNX3*, *TIMP3*, *NEUROG1*, *SOCS1*, *HLTF* et *PRDM2*.

A noter qu'il n'existe pas de distinction stricte entre les phénotypes mis en évidence, au contraire, ces phénotypes sont parfois associés ou se recoupent :

 les tumeurs de phénotypes LOH+ et MSI+ ne sont pas mutuellement exclusives et les tumeurs MSI+ sporadiques présentent un certain degré d'instabilité chromosomique⁴⁹. certaines tumeurs du cancer colorectal ont un phénotype MSI+/CIMP+ en cas d'hyperméthylation du gène *MLH1*⁵⁰ tandis que les tumeurs associées au syndrome héréditaire (Lynch) présentent un phénotype MSI+/CIMP–.

I.iii.3.d. Mutations somatiques

Comme évoqué précédemment, les différentes instabilités génomiques engendrent une accumulation d'altérations génétiques et notamment la présence de mutations spécifiques de gènes suppresseurs de tumeur et d'oncogènes. Dans le cancer, il a été suggéré que quatre à sept mutations de gènes parmi les quelques 125 gènes initiateurs reconnus suffiraient au développement d'un cancer^{38,51}. Des dérégulations de gènes par activation ou surexpression d'oncogènes (*KRAS*, *BCR-ABL*) et/ou l'inactivation ou l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*, *APC*, *SMAD4*) font partie de ces altérations.

Dans le cancer colorectal, une trentaine de gènes présentant une mutation somatique ont été identifiées dans différentes études, avec *in fine*, 8 gènes à mutations somatiques récurrentes dans le cancer colorectal (dans le cas de tumeurs non hyper-mutées et considérant seulement les gènes exprimés) : *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *APC*, *FBXW7*, *TCF7L2*, *SMAD4*, *TP53*⁵². Ces mutations somatiques ont été retrouvées à des fréquences semblables dans une étude récente utilisant le séquençage ciblé⁵³, et sont impliquées dans les voies de signalisation *RAS*, *PIK3*, *WNT*, *TGFβ*, *P53*⁵⁴.

I.iii.3.e. Une version revisitée de la cancérogenèse colorectale : vers l'identification de biomarqueurs.

La caractérisation des profils moléculaires du cancer colorectal, par l'identification d'altérations spécifiques des tumeurs, a permis de faire avancer la compréhension de la cancérogenèse de ce cancer, tel que représenté dans la **Figure 9**. Dès lors que l'identification d'altération est informative sur la présence du cancer, son évolution ou encore la réponse à un traitement donné, ces altérations peuvent représenter des biomarqueurs.



Figure 9. Implémentation de la représentation schématique des évènements de la tumorogenèse colorectale décrite par Fearon et Vogelstein en 1990. Suite aux différentes implémentations des évènements génétiques se produisant au cours de la cancérogenèse du cancer colorectal: l'aspect séquentiel en terme pathologique est complété d'altérations concomitantes mettant en jeu des dérégulations des voies de signalisation spécifiques du cancer colorectal, des instabilités génétiques et réarrangements chromosomiques promoteurs de l'occurrence de mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs ou oncogène. Adapté de Fearon & Vogelstein³⁶ et de Vilar et Gruber⁵⁵.

I.iv. Des altérations génomiques à la cancérogenèse : application à la recherche de biomarqueurs

I.iv.1.Exemple de mise en évidence de biomarqueurs du génome tumoral

L'accumulation de certaines altérations dans le génome peut aboutir au développement d'un cancer. Ainsi, la recherche d'anomalies telles que des mutations de gènes dits « drivers » s'est beaucoup répandue en pratique clinique. Le test de la présence de ces marqueurs conditionne désormais la prescription de traitement ciblé :

- les mutations du gène *KRAS* dans les cancers colorectaux conditionnent la prescription de l'anticorps anti-EGFR cétuximab⁵⁶,
- les mutations du gène BRAF conditionnent la prescription de la molécule ciblant la protéine BRAF exprimée par le gène muté (vemurafenib) dans les mélanomes malins,
- et les mutations du gène *EGFR* dans le cancer du poumon conditionnent la prescription de géfitinib et de l'erlotinib⁵⁷.

Ces exemples sont représentatifs de l'intérêt de la recherche de biomarqueur dans un cadre de médecine personnalisée, afin de tirer parti de l'essor des techniques de biologie moléculaire pour affiner le diagnostic, préciser le pronostic et prédire la réponse et la toxicité des traitements.

I.iv.2.Un biomarqueur prédictif du cancer colorectal : enjeu de la voie EGFR et intérêt du suivi des mutations RAS.

La fixation du ligand (EGF, TGF, amphi- ou épi-réguline) au récepteur EGFR entraîne l'activation du récepteur et ensuite, de deux voies de signalisation intracellulaire : la voie RAS / RAF / MEK / MAPK

et la voie PI3K / AKT / m-Tor. Dans le cancer colorectal, une suractivation de cette voie de signalisation, principalement par augmentation de l'expression des récepteurs (30 à 80 % des cas)⁵⁸ et/ou par une augmentation de la quantité de ligand⁵⁸, a été identifiée, ce qui en a fait une cible thérapeutique. Par la suite, le rôle des mutations de *RAS* et *BRAF* a été démontré.

Les isoformes de la protéine RAS sont de petites molécules GTPase de 21 kD de la famille des protéines G monomériques, localisées à l'intérieur de la membrane plasmique et qui sont codées par 3 gènes : *HRAS*, *KRAS* et *NRAS*. Les mutations de *KRAS* affectent majoritairement l'exon 2 (résidus acides aminés des codons 12, 13) et plus rarement les exons 3 et 4 (codons 61, 117 et 146). Le gène *NRAS* est lui aussi muté, bien que plus rarement sur les exons 2 et 3 (codons 12, 61)⁵⁴. Ces mutations sont retrouvées dans plus de 40% (37-40% *KRAS*, 1-7% *NRAS*) des cancers colorectaux et conduisent à une activation anormale de la voie de signalisation de l'*EGFR*. Le gène *BRAF* est lui aussi muté dans 5-10% des CCR (c.T1799A, dans 95% des cas) et son rôle dans la résistance aux anti-EGFR a lui aussi été démontré⁵⁹.

Le rôle proto-oncogène de ces protéines mutées résulte d'une activation continue des GTPases. La protéine RAS activée en continu déclenche alors une cascade de phosphorylations et l'activation des voies de signalisation d'aval qui stimulent prolifération, survie, différenciation, migration cellulaire et angiogenèse⁶⁰ tel que représenté dans la **Figure 10**.



Figure 10. Voies de signalisation PIK3 et RAS activées par la protéine RAS mutée. La cascade de phosphorylation est activée de façon permanente en raison de l'activité continue de RAS mutée stimulée en continu par les GTPases. La protéine RAS active peut également agir sur PIK3, qui engendre l'activation d'AKT⁵².

Il est maintenant établi que seuls les patients ayant une tumeur avec des gènes *KRAS*, *NRAS* ou *BRAF* non-mutés peuvent bénéficier d'un traitement anti-EGFR^{6,61,62}, ce qui a fait l'objet d'une modification de l'Autorisation de Mise sur le Marché du cetuximab et du panitumumab. Cependant, il est à noter que l'absence de mutation *RAS* ne garantit pas une réponse aux anti- EGFR (30 à 40 % des patients restent non répondeurs). Ainsi, d'autres mécanismes de résistance sont en jeu, induisant potentiellement d'autres gènes⁶³ comme *PTEN* et *PIK3CA*, décrit comme potentiels facteurs de

résistance au cetuximab^{64,65}. Les voies PIK3, TGFβ, TP53 et Wnt sont fréquemment perturbées dans le cancer colorectal, participant au processus d'oncogenèse.

I.v. Enjeux de la détection de biomarqueurs : limites des marqueurs standards

Les marqueurs circulants utilisés à ce jour en clinique, antigènes, protéines et hormones présentent certaines limites. Le niveau d'antigènes ou « marqueurs tumoraux » mesuré dans la circulation sanguine devrait refléter la quantité de cellules cancéreuses de la tumeur primaire et des métastases^{66,67}. Cependant, ces marqueurs ne sont pas mesurables chez certains patients ou bien peuvent être élevés chez des patients non atteints de cancer. En outre, un même marqueur tumoral peut être produit par des cellules cancéreuses d'origines différentes. Par exemple, le taux d'antigène carcino-embryonnaire peut être élevé en cas de cancer de l'estomac, de cancer colorectal, ou de cancer du sein^{8,66,67}.

D'autres protéines sont mesurées dans le sang, telles que l'enzyme lactate déshydrogénase utilisée comme facteur pronostique dans le mélanome⁶⁸. La LDH est aussi utilisée comme marqueur dans le cancer du testicule. De même, l'alpha-fœtorotéine serait pronostique dans le cas de cancers du foie⁶⁹ et du testicule. La spécificité de ces marqueurs reste donc discutable, limitant la fiabilité de leur utilisation.

La détection d'altérations dans l'échantillon de biopsie, au moment du diagnostic, peut aider au choix de la thérapie optimale pour le patient⁷⁰ mais peut être difficilement répétée au cours du suivi. Un tel acte présente de nombreux désagréments tant pour la santé du patient (échappement potentiel de cellules/débris tumoraux dans la circulation, difficultés du geste chirurgical⁷¹) que pour la qualité du test.

Une autre limitation à l'analyse d'échantillons de tumeur est l'hétérogénéité tumorale, due à la présence de cellules tumorales et normales au sein de l'environnement de la tumeur, mais aussi de clones tumoraux différents porteurs d'altérations génétiques distinctes⁷². Ainsi, le test des échantillons tumoraux est dépendant de la localisation du prélèvement, qui pourrait correspondre à une portion de la tumeur ne portant pas l'altération recherchée. Une étude a démontré le rôle pronostique des mutations *KRAS* détectées dans le sang, tandis que la détection de ces mêmes altérations dans la tumeur n'était pas liées à la survie⁷³.

En outre, ces clones peuvent évoluer au cours du temps et au sein des tissus primaires/métastatiques (voir **Figure 11**)⁵¹. Les biopsies, prélèvements localisés à un instant donné, ne seraient ainsi pas représentatives de l'ensemble des cellules tumorales ni de leur évolution au cours du temps.



Figure 11. Exemple de représentation de l'hétérogénéité clonale. Hétérogénéité A) spatiale: plusieurs clones existent au sein de la tumeur, la zone de biopsie est localisée de façon arbitraire à l'échelle tissulaire; B) temporelle: modifications de la représentativité de certains sous-clones tumoraux au cours de l'évolution de la maladie. T0: initiation d'une thérapie ciblée. T1: certains clones sont éradiqués mais une autre catégorie de sous clones se multiplie entre T0 et T1. Un traitement B est alors débuté, qui fait diminuer les sous clones en expansion à T1 mais le premier clone émerge à nouveau à T2. Ces hétérogénéités temporelles et spatiales peuvent rendre inefficace une thérapie, d'où l'intérêt de pouvoir caractériser les clones présents à différents temps et de façon représentative de leur présence dans la tumeur.

Depuis le développement des thérapies ciblées, les connaissances relatives aux évènements se produisant dans le génome tumoral ont évolué. En effet, l'émergence d'altérations au cours du suivi, telles que les mutations *KRAS* dans le cancer colorectal⁷⁴ ou *EGFR* dans le cancer du poumon⁷⁵, a été démontrée comme déterminante dans la réponse au traitement. Dès lors que ces altérations ont un impact sur le pronostic du patient, elles devraient pouvoir être mesurées régulièrement. Il devient alors nécessaire de pouvoir effectuer des tests de détection de ces altérations répétés au court du suivi pour orienter le choix de la thérapie, et changer le plus précocement possible le traitement en cours⁷⁶.

L'identification de marqueurs spécifiques du cancer est nécessaire afin de détecter les évènements de progression ou de récurrence de manière précoces en complément des techniques actuelles. Dans ce contexte de médecine de précision, des marqueurs circulants ont étudiés. Ils peuvent être des cellules tumorales circulantes (CTC), des vésicules extracellulaires (exosomes, vésicules extracellulaires), ou des acides nucléiques circulants (ADN, miARNs, ARNm, shARN, IncARN).

II. Emergence des biopsies liquides

Le principe des biopsies liquides repose sur le prélèvement de bio-fluides tels que le sang, pour l'analyse d'un certain nombre de biomarqueurs et de cellules non hématologiques. Dès lors que ces bio-fluides transportent des cellules ou des débris cellulaires, des protéines et d'autres particules, ils représentent une source potentielle de marqueurs de la tumeur. Ils peuvent être des CTC, qui

correspondent à des cellules non hématologiques présentant des caractéristiques malignes, ou encore des vésicules extracellulaires, et des acides nucléiques circulants, comprenant des ADN d'origine tumorale et des ARN en particulier les micro-ARNs. Ces marqueurs issus de biopsies liquides ont démontré à ce jour des résultats prometteurs⁷⁷. La **Figure 12** présente les particules circulantes retrouvées dans les fluides les plus fréquemment utilisés à ce jour pour la détection des marqueurs pré-cités.



Figure 12. Représentation des différents marqueurs circulants émergents qui peuvent être présents dans les biopsies liquides. Adapté de Brock et al.⁷⁸.

II.i. Biomarqueurs émergents : cellules tumorales circulantes (CTC), vésicules extracellulaires et acides nucléiques circulants

II.i.1. Cellules tumorales circulantes

Les CTC proviennent de la tumeur, et passent dans la circulation lymphatique ou sanguine⁷⁹. L'absence de cellules circulantes présentant un phénotype tumoral été confirmée chez des individus sains⁸⁰. Une transition rend invasives les cellules tumorales par l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux, appelée transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Le passage dans la circulation suite à une invasion de la paroi permise par cette TEM et d'autres mécanismes acquis par les cellules cancéreuses³⁸ leur permet de se disséminer et, *in fine*, de former des métastases⁸¹.

Les premières études ayant mis en évidence le rôle pronostique des CTC ont porté sur le cancer du sein avec la détection de « disseminated tumor cells » dans la moëlle épinière de patientes⁸². Leur présence fut associé à un fort risque de rechute⁸³.

De nombreux essais ont ensuite été réalisés, principalement sur le cancer du sein afin de confirmer la valeur pronostique des CTC. Dans un essai multicentrique incluant plus de 1944 patientes atteintes de cancer du sein métastatique, plus de 5 CTC étaient détectables chez 46.5% des patientes avant initiation du traitement⁸⁴. Ce seuil s'est avéré être un facteur pronostique avant
traitement et au cours du suivi. Ce résultat a été confirmé dans un essai de phase 3 incluant des patientes atteintes de cancer du sein métastatique⁸⁵. Un enjeu principal relatif aux CTC serait de pouvoir les détecter de façon précoce, avant le développement de métastases, afin d'orienter les patients à risque vers une thérapie plus adaptée que la thérapie conventionnelle. Une étude a porté sur le comptage des CTC au moment du diagnostic chez des patientes atteintes de cancers du sein de stades I à III⁸⁶. La présence d'au moins 1 CTC a été observée chez 20.2 % des 3173 patientes incluses, et a été significativement associée à la survie des patientes. Des études ont proposé d'analyse un volume plus élevé de sang afin de collecter plus de CTC, bien que le nombre de CTC détecté ne présente pas nécessairement d'utilité clinique⁸⁷.

Dans d'autres types de cancers, la valeur pronostique des CTC a aussi été démontrée, notamment dans le cancer colorectal, de l'estomac et de la prostate^{88,89}. Une étude a suggéré la faisabilité de détecter des altérations du gène *KRAS* dans les cellules circulantes chez des patients atteints de cancer colorectal⁹⁰. Les auteurs ont observé une concordance de 77% entre le statut *KRAS* dans les CTC et le tissu tumoral correspondant avec une sensibilité de 83%.

Les stratégies actuelles de détection de CTC reposent sur la discrimination des cellules par les antigènes qu'elles expriment à leur surface (« Epithelial cell adhesion molecule » (EpCAM) ; cytokeratine (Ck), par exemples), ou les propriétés physiques (leur taille et leur forme, en particulier)⁹¹. Les études décrites ont principalement utilisé le système de détection CellSearch® (Janssen Diagnostics LLC) pour le comptage des CTC, qui est la seule méthode à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché par la FDA (Food and Drug Administration)⁹² (**Figure 13**).

De façon intéressante, une étude s'est intéressée à l'impact des paramètres morphologiques des CTC sur la survie des patients. La taille, la forme et les caractéristiques relatives à la mort par apoptose, extraites à partir des images obtenues par le système CellSearch®, se sont avérées corrélés significativement à la survie, en analyse univariée⁹³. D'autres techniques de capture des CTC ont été développées et sont en évolution^{94–96} en raison de leur fort potentiel clinique, et des limites de la technique CellSearch® pour certains types de cancer.

En effet, cette méthode de détection présenterait cependant des limitations pour la capture des CTC, notamment dans le cas du cancer du poumon⁹⁷. Les CTC dans ce type de cancer n'expriment que rarement l'EpCAM, ce qui ne permet pas leur capture par le système. En outre, les cellules cancéreuses du poumon forment des aggrégats, apeplés « microemboli tumoraux circulants », qui rend difficile le comptage⁹².

1) Mise en place d'un échantillon de 7,5mL dans l'Instrument Celltracks

2) Des particules ferromagnétiques () sont insérées dans l'échantillon, et se lient aux cellules.

3) Des anticorps anti-antigènes de CTC (EpCAM, Ck) sont introduits dans le mélanges et se llent spécifiquement aux CTC





Figure 13. Description du système de capture des cellules tumorales circulantes CellSearch®. Après collection de l'échantillon, un premier appareil distribue des particules ferromagnétiques qui se lient à la surface des cellules. Ensuite, des anticorps EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) et cytokeratine (Ck), entre autres, sont injectés dans l'échantillon et se lient spécifiquement aux CTC. Enfin, l'échantillon est inséré dans une cartouche magnétique qui collecte les CTC et une analyse par immunofluorescence est réalisée à l'aide d'un logiciel⁹⁸.

II.i.2. Vésicules extracellulaires

Ces vésicules extracellulaires sont principalement des exosomes, microvésicules et corps apoptotiques⁹⁹, ces derniers étant peu caractérisés car rapidement éliminés par phagocytose.

Les microvésicules, de taille d'environ 1000 nm, délivreraient des molécules bioactives dans la circulation, et interagissent avec des cibles spécifiques¹⁰⁰. Elles seraient plus nombreuses dans certains types de cancers¹⁰¹ indiquant une valeur pronostique potentielle.

Les exosomes sont des vésicules de taille variant de 30 à 100 nm résultant de la fusion de la membrane plasmique avec des corps vésiculaires. En circulation, ils fusionnent avec la membrane d'autres cellules et libèrent leur contenu, reflet de la cellule dont ils proviennent¹⁰². Le rôle des exosomes dans le cancer a été mis en évidence¹⁰³.

Les exosomes sont porteurs d'ARN sous forme complexée¹⁰⁴. De nombreux travaux ont porté sur la détection de micro-ARN. Une étude a porté sur le rôle pronostique des micro-ARN transportés par les exosomes dans le cancer colorectal¹⁰⁵. Zhang L. *et al.* ont étudié l'impact des micro-ARN provenant d'exosomes qui inactiveraient *PTEN* par l'influence du microenvironnement tumoral, et favoriseraient la formation de métastases cérébrales¹⁰⁶. De manière intéressante, les exosomes exerceraient un rôle sur la sensibilité au traitement par le biais de la libération de micro-ARN, comme cela a été suggéré par une équipe dans deux études portant sur le cancer du sein^{107,108}.

Une étude a décrit des méthodes d'isolation des exosomes à partir de sérum et d'urine puis l'analyse par séquençage de leur contenu en ARN a suggéré une forte proportion d'ARN de transfert et d'ARN ribosomiques¹⁰⁹.

Des ARN messagers ont été aussi été détectés dans les exosomes, leur quantité serait moins élevée que les ARN non codants^{110,111}. Les ARN messagers présents dans les exosomes seraient impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de la division cellulaire et de l'angiogenèse¹¹¹. Chez des patients atteints de glioblastome, de l'ARN messager issu de la transcription du gène *EGFR* muté a été détecté à partir d'exosomes¹¹⁰. De façon intéressante, dans leur étude, Mullet *et al.* ont observé que le niveau d'expression de gènes impliqués dans l'immunité était corrélé à la survie de patients atteints de gliome et traités par immunothérapie¹¹².

De façon plus controversée, les exosomes contiendraient de l'ADN¹¹³. En effet, des acides nucléiques porteurs d'altérations spécifiques de la tumeur d'individus ont été identifiés dans une étude de Kahlert et collaborateurs. Ces derniers ont détecté la présence de mutations *TP53* et *KRAS*, et suggéré la présence de fragments de taille supérieure à 10kb¹¹⁴.

Les exosomes influent sur le système immunitaire par le convoi « horizontal » de matériel entre les cellules tumorales et celles de l'immunité promouvant la progression par la reprogrammation des cellules¹¹⁵. Ces vésicules seraient également impliquées dans la mise en place de niches prémétastatiques^{115,116} et favoriseraient ainsi la tumorigenèse¹¹⁷.

Les exosomes pourraient ainsi présenter un intérêt thérapeutique par la détection précoce de marqueurs. Toutefois, une meilleure caractérisation de ces particules est requise, notamment sur la discrimination entre exosomes dérivés de la tumeur de ceux dits « normaux », qui reste encore un défi¹¹⁸.

II.i.3. Les acides nucléiques circulants : ARN circulant

Les micro-ARN circulants ont été décrits comme de potentiels biomarqueurs pour le diagnostic, le suivi de la réponse au traitement ou encore le pronostic¹¹⁹. Ils se présentent sous forme de petits ARN non codants et ont pu être détectés dans les bio-fluides¹²⁰ bien que leur analyse présentent des défis^{121,122}.

Leur potentiel comme outil diagnostique a été mis en évidence dans le cancer colorectal¹²³ ou le cancer du poumon¹²⁴, par exemples. Notamment, l'analyse du niveau d'expression de plusieurs micro-ARN aurait un intérêt pour le diagnostic du cancer de l'estomac¹²⁵ ou encore du cancer colorectal, avec la mise en évidence de signatures qui seraient plus pertinentes que l'analyse d'un micro-ARN unique¹²⁶. La valeur pronostique des micro-ARNs a été interrogée, par exemple dans l'étude de Sahlberg *et al.* portant sur le cancer du sein et visant à évaluer le risque de rechute et la survie chez des patientes triple négatives¹²⁷.

Le potentiel rôle prédictif des micro-ARN a été étudié dans une étude visant à déterminer le lien entre le niveau de micro-ARN mesuré dans le sérum au cours du suivi et la réponse au traitement¹²⁸.

Les "competiting endogenous" ARN comme nommés dans la revue de Cheng *et al.* représentent les ARN messagers, micro-ARN et autres ARN non codants qui forment un « réseau » et interagissent ensemble¹²⁹. Ces interactions peuvent avoir un impact sur leur rôle dans la

cancérogenèse dès lors qu'elles sont dérégulées, soulignant le rôle potentiel de signatures d'ARN impliquées dans le cancer.

Certains ARN (notamment les ARN messagers) présentent une stabilité faible dans la circulation sanguine. Leur transit par des complexes extracellulaires représente donc une source de détection de ces ARN qui permettrait d'évaluer leur potentiel clinique.

II.i.4. Les acides nucléiques circulants : ADN circulant

L'ADN tumoral circulant (ADNtc) peut être transporté sous formes complexées avec les histones ou nucléosomes ou circuler sous forme de fragments libres^{130,131}. Bien que de nombreux travaux aient porté sur les potentielles applications cliniques de l'ADNtc, pour les aspects diagnostique, pronostique ou prédictif, des interrogations persistent encore quant au processus de libération de l'ADN et à sa stabilité dans le sang^{130,132,133}. Des études ont pu montrer que l'ADNtc était porteur des altérations génétiques de la tumeur^{134,135}, et suggérer que la quantité mesurée était représentative de la masse tumorale, notamment par le développement de modèles de xénogreffes^{135–137}. Chez des patients, les évaluations en imagerie en comparaison aux mesures d'ADNtc ont suggéré que la quantité d'ADN tumoral plasmatique était liée aux variations de la taille des lésions^{138–140}.

Dans le même temps, des travaux appliqués à divers types de cancer ont permis de mettre en évidence la présence d'ADNtc^{141–143} (**Figure 14**), soulignant le potentiel clinique de ce marqueur. L'ADNtc a été décrit comme représentatif de l'hétérogénéité tumorale des sites tumoraux et métastatiques d'un individu^{7,74,144}, justifiant le terme de biopsie liquide. L'étude de l'ADNtc pourrait ainsi représenter une alternative aux biopsies solides, comme suggéré par des études portant sur la détection de l'ADNtc dans plusieurs types de cancers^{141,145}. En particulier, il a été suggéré que la détection de mutants rares dans le plasma permettait de détecter la résistance aux traitements ciblés anti-EGFR dans le cancer colorectal, ce qui fut une des premières démonstrations de son intérêt clinique¹⁴⁶, qui fut ensuite plus largement explorée^{147–149}.



*Figure 14. Fréquence de détection d'ADNtc chez les patients dans quinze types de cancer différents. Issu de Bettegowda et al.*¹⁵⁰. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance (95%) relative à la moyenne.

Les CTC, les vésicules extracellulaires et les acides nucléiques présentent divers avantages quant aux analyses réalisables.

Les CTC sont directement issues de la tumeur, étant encore vivantes elles permettent d'avoir accès à certaines propriétés morphologiques de la tumeur. En revanche, leur capture peut être délicate et leur quantité est peu élevée⁹¹. Les ADNtc sont informatifs quant aux altérations génétiques de la tumeur, mais ne permettent pas d'étudier le profil d'expression tumoral. Les exosomes, par le transport de divers ARN non codants et d'ARN messagers qu'ils contiennent, représentent une source d'information attractive. Ils peuvent en outre, tout comme les ADNtc, être détectés dans des échantillons stockés dans des bio-banques. Une étude intégrative des données produites à partir des CTC, des exosomes, des ARN et de l'ADNtc pourrait potentiellement permettre la mise en évidence d'une signature moléculaire multi-marqueurs^{77,78}.

Capacité d'analyse	Exemples	стс	Exosomes	ADNtc
Altérations génétiques	Mutations ponctuelles, amplifications, translocations	oui	oui	oui
Modifications épigénétiques	Hyperméthylation de promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs	oui	oui	oui
Analyse du profil de transcription	ARNm, micro-ARN, long ARN non codants	oui	oui	non
Phénotypes tumoral	Morphologie cellulaire, études in vivo	oui	non	non
Etude systémique (inflammation, stroma)	Marqueurs protéiques ARN inflammatoires	non	oui	non
Analyse de l'ARN et protéines provenant des cellules tumorales	Combinaisons d'ARN, protéines complexes	oui	oui	non
Possibilité d'utiliser des échantillons de bio- banques	Plasma, sérum, urine, fèces	non	oui	oui

Tableau 2. Comparaison des capacités d'analyses offertes par les biomarqueurs circulants: CTC, exosomes et ADNtc. Adapté de Brock et al⁷⁸

II.ii. Les ADN circulants : historique de l'ADNtc et caractéristiques biologiques

II.ii.1. Mise en évidence de l'ADN libre circulant et de l'ADNtc

Les ADN circulant librement dans le sang ont été identifiés par Mandel et Métais et décrits en 1948¹⁵¹. De l'ADN double brin de bas poids moléculaire a été décrit, avec une taille de moins de 100 pb à plusieurs centaines de pb. Des fragments d'ADN circulant de tailles de 180-200 pb sont classiquement détectés en conditions non pathologiques, observés dans le sang maternel avec la détection d'ADN fœtal^{152,153}. Une quantité plus élevée d'ADN circulant a été observée chez des patients atteints de pathologies telles que les maladies immunes, inflammatoires¹⁵⁴ ou simplement chez des sujets sains ayant réalisé un effort physique intense, indiquant une libération par des cellules normales. Leon et collaborateurs ont ensuite démontré et confirmé par des études plus récentes que la quantité d'ADN circulant chez les patients atteints de cancer était plus importante que chez les individus sains^{154,155}.

Une comparaison entre les concentrations d'ADN circulant dans le cas de maladies (bénignes ou de cancers) (plus de 400 ng/mL) et les concentrations mesurées chez des sujets sains (1-100 ng/mL) a suggéré l'intérêt de la détection de l'ADN circulant¹⁵⁶.

Stroun a mis en évidence par la suite des instabilités chromosomiques présentes dans l'ADN circulant et caractéristiques des cellules de la tumeur d'origine^{157–159}. L'identification de mutations de l'oncogène *KRAS* chez des patients atteints de carcinome pancréatique dans deux études a été initiatrice de l'intérêt clinique porté à l'ADNtc^{160,161}.

II.ii.2. Origine de l'ADN circulant chez des patients atteints de cancer

L'ADNtc a pu être observé en quantités variables au travers des études, et a été observée comme plus importante chez des patients atteints de cancer métastatique¹⁶². L'ADNtc est porteur des altérations génétiques de la tumeur^{130,134} (**Figure 15**). Dès lors que la masse tumorale est importante,

une accumulation de débris cellulaires par les processus de nécrose et/ou d'apoptose est inévitable, menant à de fortes concentrations en ADN mis en circulation¹⁶³.

En conditions physiologiques basales, la phagocytose permet la clairance des débris cellulaires¹⁶⁴. Une libération active par des cellules vivantes (lymphocytes et autres cellules du système immunitaire) ou encore la lyse cellulaire ont aussi été suggérées comme sources d'ADN circulant¹⁶⁵. L'ADN circulant serait cependant principalement libéré par les cellules en processus de mort cellulaire¹⁶⁶.

Les données reportées concernant l'origine apoptotique ou nécrotique de l'ADNtc donnent lieu à débat. Parmi les premières études s'intéressant à ces considérations, Jahr *et al.* ont quantifié l'ADN circulant de patients présentant différents types de cancers, et suggéré l'origine à la fois apoptotique et nécrotique des fragments¹⁶⁶, tandis qu'une étude antérieure suggérait une origine apoptotique¹⁶⁷. Plus tard, l'équipe de Schwarzenbach a observé la présence de fragments longs circulants et donc d'origine sensiblement nécrotique¹³⁰, ce qui a été ensuite contredit par des études récentes^{133,168}.

L'origine apoptotique semble toutefois s'imposer avec un grand nombre d'études comparant des ADN plasmatiques de patients et de contrôles sains. Des multiples de tailles de complexe nucléosomique ont été reportés dans les deux cas, avec une prédominance de multiples plus petits chez les patients¹³³.



Figure 15. Libération par la tumeur d'ADN circulant dans les vaisseaux sanguins. La tumeur libère dans la circulation sanguine divers éléments. Notamment, les cellules tumorales circulantes, encore vivantes, peuvent être détectées. D'autres composants tels que les complexes libérés au cours de la mort cellulaire (corps apoptotiques, vésicules, nucléosomes) peuvent être observés. L'ADN libre circulant peut aussi être détecté dans le sang de patients atteints de cancer et il est porteur des altérations de la tumeur (ADNtc). Ainsi, les altérations génétiques (instabilités microsattelitaires, mutations, méthylation) peuvent être quantifiées par simple prise de sang. Issu de Schwarzenbach et al¹³⁰.

II.ii.3. L'ADN muté circulant

Les altérations ponctuelles d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs sont les évènements les plus fréquemment ciblés dans les biopsies de patients. Ainsi, ces évènements sont les plus recherchés et détectés dans l'ADN circulant, avec notamment les mutations des gènes *KRAS*, *BRAF*,

PIK3CA, *APC* ou *EGFR*⁵¹. A titre d'exemple, les mutations du gène *KRAS* ont été souvent ciblées^{6,169}, en raison de leur fréquence importante dans plusieurs types de cancers tels que les tumeurs colorectales¹⁷⁰, du poumon¹⁷¹, du pancréas¹⁶⁰, de la thyroïde¹⁷².

Etant donné les cibles thérapeutiques actuellement évaluées dans les essais cliniques, telles que les gènes des voies de signalisation Wnt, PIK3, p53, TGFβ, RAS/RAF impliquées dans la cancérogenèse, il est d'intérêt de détecter des mutations potentielles de ces gènes, qui pourraient être des facteurs potentiels de résistance dès lors qu'ils sont situés en aval de la cible thérapeutique. Ainsi, la détection de mutations dans le plasma de patients dans le cadre de thérapies ciblées, par exemple dans le cancer colorectal, ont démontré l'intérêt clinique de sa détection¹⁴³. L'utilité potentielle de l'ADN muté circulant peut être évaluée en regard des marqueurs standards tels que les protéines (antigènes, hormones), qui sont parfois peu spécifiques ou sensibles, comme décrit plus haut^{140,173}.

Bettegowda et collaborateurs ont mené une étude « pan-cancer » qui évaluait en partie le pourcentage d'ADNtc détectable chez des patients atteints de divers types de cancers. Ils ont démontré la faisabilité de la détection dans des cas de cancers plus ou moins avancés.

II.iii. Application de la détection l'ADNtc à de nouvelles altérations: vers de nouveaux marqueurs circulants spécifiques de la tumeur

D'autres altérations sont spécifiques des tumeurs et peuvent être retrouvées dans la circulation sanguine. Ces altérations peuvent être des réarrangements génétiques, la méthylation de l'ADN ou encore l'intégrité de l'ADN circulant (**Figure 15**).

II.iii.1.a. Identification d'altérations chromosomiques

Des altérations autres que les mutations somatiques ponctuelles sont explorées comme des stratégies de détection de l'ADNtc. Les réarrangements chromosomiques et les variations du nombre de copies (amplifications) peuvent être détectés dans le plasma de patients atteints de cancer^{174,175}. Une méthode appelée « personalized analysis of rearranged end » (PARE) permet d'identifier les réarrangements dans la tumeur afin de développer de nouveaux biomarqueurs¹⁷⁶.

Il existe aussi le caryotypage du génome pour la détection des altérations du nombre de copies géniques¹⁷⁷. Le séquençage de génome entier à partir de l'ADN plasmatique a permis de détecter des arrangements aberrants de fragments par analyse « paired-end ». Les régions de gènes d'intérêt sont ciblées et le comptage du nombre de régions aberrantes permet, en comparaison à des analyses sur ADN de sujets sains ou à des séquences de références, de déterminer les variations du nombre de copies dans les régions amplifiées¹⁷⁴.

Ces méthodes utilisent le séquençage NGS pour la détection des réarrangements, amplification ou aneuploïdie. Dès lors qu'une telle altération est identifiée dans la tumeur, un suivi peut être effectué au cours du temps par une analyse de l'ADN extrait de prélèvements de plasma, de la même façon que les mutations sont quantifiées¹⁷⁸. Cette approche peut être réalisée sans connaissance *a priori* d'une altération de la tumeur, comme c'est le cas de la détection des amplifications de *ERBB2/HER2* ou des réarrangements *ALK* ciblés dans le cas de cancers du sein ou colorectaux¹⁷⁴.

II.iii.1.b. Altérations épigénétiques portées par l'ADNtc

Parmi les altérations moléculaires spécifiques du cancer, les changements de niveau de méthylation au niveau de séquences régulatrices de gènes ont été reportés. L'hyperméthylation de l'ADN circulant plasmatique a été décrite dans diverses études^{179–181}. Notamment, des travaux ont démontré la faisabilité de détecter une méthylation anormale de plusieurs gènes clefs dans les voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse tels qu'*APC*, *KRAS*, *p16*, *MLH1*^{146,182} (**Figure 16**).

La méthylation a été décrite comme un évènement précoce dans le développement tumoral ce qui en fait un marqueur potentiellement très sensible d'où l'intérêt d'une application diagnostique¹⁸³. Un intérêt particulier est porté à la détection de l'hyperméthylation du gène de la septine 9 pour le diagnostic précoce du cancer colorectal^{184,185}. Sur cette base, un test de dépistage à partir d'un échantillon de sang collecté, a été commercialisé par la société Epigenomics en 2009¹⁸⁶.

L'hypermethylation de gènes suppresseurs de tumeurs dans l'ADN circulant dans le sérum de patients a été décrite dans différents types de cancer, notamment le cancer du poumon³¹, du colon¹⁸⁷ et du sein¹⁸⁸, confirmant la provenance tumorale d'une partie de l'ADN libre circulant.

La méthylation n'est pas un processus binaire, au contraire d'une altération ponctuelle de l'ADN circulant. La spécificité de la méthylation reste encore un paramètre à explorer en raison de la variabilité de son niveau d'un tissu à l'autre. Certaines modifications épigénétiques dans la tumeur pourraient être présentes dans les tissus non tumoraux. Il est donc requis de sélectionner les gènes candidats les plus appropriés pour tester l'ADNtc, en vérifiant leur spécificité par une comparaison au tissu adjacent et à l'ADN de sujets sains.



Figure 16. Pourcentages (%) de méthylation détectés dans la tumeur (A) et sensibilités de détection clinique et analytique dans le plasma correspondant (B) de patients atteints de cancer colorectal d'après les travaux de Lee et al. En (A) sont représentés les pourcentages de méthylation de 10 gènes mesurés chez 243 patients et chez 148 sujets sains. Une forte prévalence de méthylations aberrantes est observée pour les 10 gènes testés dont WIF1 (valeur la plus élevée dans les tissus) dans le tissu tumoral de patients (A) et le plasma (B) correspondant. La sensibilité clinique se réfère à la proportion de patients dont l'échantillon d'ADN plasmatique est positif pour l'hyperméthylation du gène testé; la sensibilité analytique correspond à la concordance entre les échantillons de tumeur et les échantillons d'ADN plasmatique positifs pour le test de l'hyperméthylation. Issu de Lee et al¹⁸².

II.iii.1.c. Intégrité de l'ADNtc

Comme décrit dans le paragraphe « origine de l'ADNtc », des résultats de la littérature décrivent une taille de fragments d'ADN circulants plus ou moins grande, qui serait dépendante du processus de mort cellulaire menant à la libération de l'ADNtc¹⁶⁶. Dans le cas de l'apoptose, processus de mort programmée, des étapes se succèdent avec la formation de corps apoptotiques, qui contiennent des éléments de la cellule, dont de l'ADN. Les débris cellulaires sont retrouvés sous forme de complexes nucléosomiques (180-200 pb) et de multiples de nucléosomes. Dans le processus de nécrose, une inflammation se produit, les membranes plasmiques sont détruites ce qui conduirait à la libération de fragments de grandes tailles¹³⁰ (**Figure 17**).



Figure 17. Représentation de l'influence du mécanisme de libération de l'ADN tumoral dans la circulation sanguine. Selon que la mort cellulaire se produit par apoptose, nécrose ou qu'il s'agit d'une libération active, diverses structures sont générées. La nécrose a été décrite comme aboutissant à la libération de gros débris cellulaires non traités par la machinerie apoptotique. Ainsi, les fragments libérés seraient de tailles variables, souvent décrits comme plus longs que dans le cas de l'apoptose, donnant lieu à des fragments de 180-200 pb. La libération active aboutit à la mise en circulation de complexes lipo-protéiques qui conduisent à la formation de fragments circulants relativement courts. Issu de la thèse de F. Moulière¹⁸⁹.

L'intégrité des séquences génomiques non codantes telles qu'ALU et LINE1 ont été décrites dans de nombreuses études portant sur différents types de cancers^{190–192}. L'intégrité de ces séquences répétées dans le génome humain a été déterminée par le calcul d'un index d'intégrité de l'ADN (DNA Integrity Index, DII). Des comparaisons de ce DII chez des individus sains et atteints de cancer ont permis de mettre en évidence une différence de fragmentation, démontrant un rôle potentiel de biomarqueur du cancer^{193,194}. Des applications pour le diagnostic, ou l'évaluation de la réponse au traitement des patients ont été explorées^{195,196}. Cependant, les résultats sont discordants entre études, et ce parfois pour un même cancer. Par exemple, certaines études portant sur le cancer du sein ont déterminé que l'ADN circulant est plus fragmenté¹⁹⁷ et d'autres qu'il est plus intègre^{191,198}. En outre, quantifier de telles séquences ne permet pas de différencier l'ADN libéré par des cellules normales de celui provenant de la tumeur.

Plus récemment, la taille des fragments d'ADN mutés circulants a été étudiée, permettant de cibler spécifiquement l'ADN provenant de la tumeur. Dans un travail portant sur le mélanome métastatique, les auteurs ont utilisé un test ciblant la mutation *BRAF* (p.V600E) et des amplicons de 67 ou 180 pb pour déterminer le DII. L'ADN muté *BRAF* dans le plasma des patients était plus fragmenté que celui de sujets sains¹⁹⁹. Dans une autre étude, Moulière et collaborateurs ont pu montrer que l'ADNtc est très fragmenté chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique, par la mise au point d'un modèle de xénogreffe. L'analyse de l'ADNtc libéré dans le plasma des souris greffées indiquait une forte fragmentation par la détermination du DII et de la quantification en qPCR de courts amplicons¹⁶⁸. Une technique (Intplex), développée par les mêmes auteurs, consiste en l'analyse de l'ADN muté en ciblant un fragment court -sa taille pouvant varier- et un fragment long comprenant le premier afin d'obtenir un ratio permettant d'obtenir le DII²⁰⁰. Enfin, une étude utilisant le séquençage a permis de confirmer la présence de multiples de nucléosomes dans le plasma de patients atteints de cancer du pancréas¹³³. De façon générale, les résultats publiés récemment tendent à s'accorder sur la fragmentation élevée de l'ADNtc.

II.iv. Applications cliniques de la détection de l'ADNtc

La perspective de la détection de l'ADNtc pour une utilisation clinique concerne cinq principaux aspects : 1) l'orientation thérapeutique, 2) le suivi de l'évolution tumorale, 3) la détection de maladie résiduelle minime, 4) la détection de la récidive ou encore de 5) la résistance au traitement (**Figure 18**).

II.iv.1. Orientation thérapeutique au diagnostic

En pratique clinique, dans le cancer colorectal métastique, un traitement alternatif est administré au patient lorsqu'une mutation de résistance aux thérapies anti-EGFR est détectée dans l'échantillon tumoral. De la même façon, en cas d'identification d'une mutation de résistance du gène *EGFR* ou encore un remaniement du gène *ALK*, chez des patients atteints de cancer du poumon, une thérapie alternative est choisie. Le test des échantillons de biopsie pour la présence de mutations spécifiques est de plus en plus pratiqué, permettant d'orienter le choix de la thérapie.

Cependant, pratiquer une biopsie consiste en acte invasif qui peut être douloureux, requérant parfois une hospitalisation donc potentiellement coûteux, ou encore, le tissu pourrait être compliqué à prélever, notamment dans le cas de cancer du poumon ou de métastases. Le test de la présence d'altérations déterminantes dans le choix de la thérapie pourrait alors s'effectuer par la détection d'ADNtc dans le sang.

Des résultats prometteurs ont été démontrés au cours d'une étude portant sur 18 types de cancers différents (N=34 patients), qui a comparé la détection d'altérations dans l'échantillon de biopsie et dans l'échantillon d'ADNtc. Chez 27 patients, 28 des 29 altérations génétiques détectées dans les tissus de biopsie ont été détectées dans l'ADNtc¹⁴⁵. Une altération non détectée dans le tissu a été identifiée dans un échantillon d'ADNtc. Concernant les 7 autres patients de l'étude, l'analyse du tissu n'avait pas été réalisable tandis que l'ADNtc avait pu être détecté. L'utilité clinique de la détection de l'ADN muté a récemment été concrétisée dans un cas précis avec l'autorisation officielle de

procéder à un test sanguin évaluant la présence d'ADN tumoral porteur d'une mutation sensibilité à un inhibiteur de tyrosine kinase (erlotinib) dans le cancer du poumon¹¹.

II.iv.2. Suivi et orientation thérapeutique

Les marqueurs standards en clinique pour le suivi et l'orientation thérapeutique des patients reposent sur l'imagerie, avec la détermination des critères RECIST (**Figure 18**) et le dosage des marqueurs protéiques circulants sanguins. Les limites de ces biomarqueurs pour le suivi des patients ont été décrites précédemment dans ce manuscrit. Il existe donc un manque de marqueurs fiables et sensibles en routine clinique.

L'ADNtc se présente comme un biomarqueur moléculaire offrant la possibilité de monitorer le cancer tout au long du traitement pour une évaluation pronostique et une orientation thérapeutique précise et sensible. En effet, la demi-vie de l'ADNtc serait de moins de deux heures, une telle clairance permet d'effectuer des mesures répétées qui reflètent l'évolution tumorale²⁰¹. Les variations d'ADNtc pourraient permettre d'anticiper les résultats d'imagerie jusqu'à plusieurs semaines¹⁴². Grâce au suivi d'une altération propre à chaque cancer, des études ont démontré la capacité de l'ADNtc à représenter précisément les variations tumorales chez des patients atteints de cancer métastatique du sein¹⁴², de mélanome²⁰² ou de l'ovaire²⁰³, par exemples.

II.iv.3. Détection de maladie résiduelle minime

Suite à une chirurgie ou un traitement à but curatif, beaucoup de patients sont en rémission voire en guérison, lorsque le cancer est à un stade précoce. Il existe des examens cliniques après chirurgie permettant d'évaluer l'agressivité des tumeurs (classification TNM). Cependant, ils ne permettent pas de déterminer la présence de maladie résiduelle. Des cellules et autres débris cellulaires peuvent persister suite à l'acte chirurgical, et s'infiltrer dans la circulation sanguine, menant à la libération d'ADN circulants. Une analyse de la pièce opératoire permettrait de détecter d'éventuelles altérations génétiques à cibler dans le sang, afin d'évaluer la présence de maladie résiduelle. Cela faciliterait la décision thérapeutique quant à l'administration d'un traitement adjuvant plus ou moins agressif.

Dans l'étude de Diehl et collaborateurs portant sur le cancer colorectal²⁰¹, le profil mutationnel des tumeurs avait été évalué et une mutation identifiée a ensuite été ciblée dans le plasma des patients pendant 2 à 5 années de suivi. Chez tous les patients qui présentaient de l'ADNtc après la chirurgie, une récidive s'est produite. En revanche, chez les patients dont l'ADNtc était négatif après chirurgie, il n'y a pas eu récidive.



Figure 18. Potentiel clinique de l'analyse de l'ADNtc. La détection de l'ADNtc présente plusieurs intérêts dans la prise en charge du cancer: 1) pour la détection au cours du suivi, et l'évaluation de la réponse au traitement de façon plus sensible que les évaluations par imagerie, peu fréquentes et difficilement précises; 2) pour la détection de maladie résiduelle, 3) pour la détection précoce d'un processus de résistance au traitement ou encore pour la mise en place d'un test diagnostic. U.A. : unités arbitraires.

Il.iv.4. Détection et suivi de la résistance au traitement

L'apparition d'altérations génétiques au cours d'un traitement peut rendre inefficace la thérapie suivie par différents processus tels que l'activation de la voie de signalisation visant à être bloquée par le traitement, l'amplification des récepteurs membranaires ou des ligands. Dans le cadre des thérapies ciblées, les exemples types sont l'émergence des résistances thérapeutiques aux anti-EGFR dans les cancers du poumon et du colon. La mutation de résistance p.T790M a pour conséquence l'expression d'une forme du récepteur EGFR constitutionnellement active et représente plus de 50% des évènements de résistance aux traitements anti-tyrosine kinase²⁰⁴. Cette mutation a été détectée dans le plasma de patients atteints de cancer du poumon au cours de leur suivi^{205,206}. Parmis les premières études portant sur les mutations de l'EGFR, l'étude de cas de Marcq *et al.* présentait le suivi de 2 patients atteints d'adénocarcinome du poumon a suggéré que la présence de mutation(s) de l'EGFR dans l'ADN plasmatique était liée à la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI)⁷⁵. En particulier chez un patient non répondeur au traitement, la mutation de sensibilité p.L858R de l'EGFR était détectée à des niveaux similaires au cours du suivi tandis que la mutation de résistance p.T790M est apparue.

L'impact des clones rares sur la survie des patients atteints de cancer colorectal a également été étudié. L'étude de Laurent-Puig *et al.* a démontré que la survie des patients dont la tumeur présentait moins de 1% de mutation *KRAS* était identique à celle des patients dont la tumeur n'était pas mutée, suggérant qu'il existe un bénéfice thérapeutique en dessous d'un certain seuil de mutation de résistance¹⁴³. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Tabernero *et al.*, les auteurs ont

observé qu'une fraction de 1% ou plus des allèles mutés *RAS* ou *BRAF* optimisait la valeur prédictive de la fraction d'ADN muté sur la survie globale et la survie sans progression²⁰⁷. Dans l'étude de Misale *et al.*, la résistance à la thérapie anti-EGFR a été observée au cours du suivi, et dès lors que la thérapie ciblée était stoppée, une diminution de la détection de la mutation était observée dans l'ADN circulant¹⁴⁸. De façon particulièrement intéressante, des tests de l'ADNtc plasmatique au cours du suivi de patients traités par anti-EGFR ont démontré la faisabilité de mesurer l'émergence de mutations de résistance *KRAS*, *BRAF* ou *NRAS*. Un tel suivi permettrait de moduler le traitement des patients⁷⁴, afin d'utiliser le bénéfice des thérapies ciblées pour obtenir une réponse tumorale, et éventuellement d'alterner avec d'autres agents thérapeutiques au moment de l'émergence de clones.

II.v. Enjeux relatif à la détection sensible et quantitative de l'ADNtc

Les aspects relatifs aux applications cliniques de l'ADNtc suggèrent la nécessité d'utiliser des outils sensibles et précis. En effet, il ne s'agit pas de donner une réponse binaire quant à la présence d'ADNtc, mais de pouvoir détecter au plus tôt une variation de la quantité en ADNtc.

Surveiller une maladie résiduelle minime est un enjeu puisque la thérapie a éliminé une grande partie voire la totalité des cellules tumorales. Dans les cas précoces de cancer la masse tumorale peut être faible, et la libération d'ADN alors infime. Dans la configuration du suivi de patients dont le cancer est avancé, la masse tumorale est plus importante donc en théorie la quantité d'ADN circulant aussi. Cependant, au cours du suivi, celle-ci diminue en cas d'efficacité thérapeutique.

Détecter une augmentation de l'ADNtc dans les cas de résistance au traitement ciblé avec l'émergence d'un clone ou encore détecter précocement une récidive nécessite une technologie très sensible. Afin de pouvoir détecter de très faibles variations d'ADNtc dans les cas de non-réponse au traitement ou de résistance, une technique quantitative et précise est requise. En effet, pour comparer l'ADNtc aux biomarqueurs actuels (imagerie, marqueurs protéiques), il faut pouvoir mesurer précisément la concentration plasmatique en fragments circulants. Evaluer la capacité de l'ADNtc à remplacer / complémenter l'imagerie repose sur l'utilisation de technologies robustes, offrant une large gamme dynamique et atteignant une sensibilité permettant de détecter des variations très faibles d'ADNtc (**Figure 19**).



Figure 19. Enjeux clinique et quantitatif de la détection de l'ADN circulant. Le challenge serait de pouvoir détecter avant l'apparition de lésions par imagerie afin d'aller vers un diagnostic précoce et non invasif (1). Le suivi par les biopsies liquides permettrait une évaluation en série car peu invasive, et serait une méthode de mesure de la réponse tumorale (2), de l'émergence de résistance ou récidive (3) complémentaire des marqueurs cliniques actuels. Ainsi, pour pouvoir suivre l'évolution du cancer, la sensibilité de la technique utilisée doit permettre de détecter de très faibles variations/quantités. Adapté de Ludwig J.A. et al.²⁰⁸

III. Techniques de détection de l'ADN tumoral circulant

III.i. Enjeux quantitatifs : nécessité de procédures adaptées

La détection sensible et quantitative de l'ADNtc est dépendante de facteurs à la fois biologiques et techniques²⁰⁹. Pour être capable de quantifier les fragments d'ADNtc de façon hautement précise, des défis technologiques ont dû être relevés.

III.i.1. Aspects biologiques

Il existe une variabilité importante des quantités d'ADN libre circulant mesurées selon la durée écoulée depuis le prélèvement, l'état physiopathologique du patient et d'autres paramètres tels que le sexe du patient¹⁵⁵. L'ADNtc peut représenter moins de 0,01 % de l'ADN circulant total pour des cancers à un stade précoce¹⁴⁶, et plus de 50 % pour des cancers métastatiques^{148,149,210}.

En outre, l'ADN circulant aurait une demi-vie de moins de 2 heures¹⁷⁰, l'extraction d'ADN libre circulant doit donc idéalement être réalisée moins de 2 heures suivant le prélèvement afin d'éviter toute dégradation. A noter que peu d'études ont porté sur la clairance de l'ADNtc, dont le mécanisme reste à ce jour peu établi. Des travaux réalisés par les mêmes investigateurs ont abouti à des résultats discordants sur la clairance de l'ADN fœtal circulant, d'abord évaluée à 16 minutes²¹¹, mais qui se produirait plutôt selon une cinétique en deux phases avec une élimination rapide suivie d'une phase d'elimination lente²¹².

Il est préconisé de centrifuger le sang collecté à grande vitesse pour s'affranchir de la présence d'ADN de cellules sanguines ou de débris, afin de récupérer la fraction plasmatique ou la fraction sérique²¹³. Les études ont à ce jour en majorité porté sur l'analyse d'ADN circulant provenant du plasma.

Notamment, une étude a démontré que le plasma était une meilleure source que le sérum pour la détection d'altérations du gène *EGFR* dans l'ADN lcirculant de patients atteints de cancer du poumon²¹⁴. La collecte du sérum est réalisée sans anticoagulant ce qui pourrait être source de dégradations cellulaires et de libération d'ADN non circulant, ce qui pourrait fausser les résultats. El Messaoudi *et al.* ont observé qu'un délai de centrifugation inférieur à 4h suivant la collecte était préconisé pour récupérer un taux optimal d'ADN circulant²¹³.

A noter cependant que certains tubes de collection du sang (Streck, BCT®) permettraient une meilleure conservation que les tubes EDTA classiquement utilisés. Denis *et al.* ont conservé 10 échantillons à température ambiante pendant 2, 4, 7 et 10 jours. Les auteurs ont observé que la quantité d'ADNtc augmentait avec les tubes EDTA au cours des jours signifiant une lyse des cellules sanguines. En revanche, la quantité d'ADNtc était identique avec les tubes Streck dans la majorité des échantillons (2/10).

De plus, les échantillons biologiques collectés en clinique sont exposés à de potentiels inhibiteurs de PCR comme l'héparine, l'EDTA, le dodécylsulfate de sodium (SDS), pouvant inhiber l'amplification des ADN cibles.

Les pratiques de collecte et de stockage diffèrent entre laboratoires, générant des facteurs de variabilité. Une comparaison stricte entre études est ainsi difficile. Les bonnes pratiques pré-

analytiques de l'ADN circulant ont été évaluées par Messaoudi et collaborateurs²¹³ afin de déterminer les conditions optimales de conservation avant l'analyse de l'ADN circulant. Notamment un stockage à -80°C des plasmas et jusqu'à une période limitée à quelques mois. En outre, les kits utilisés pour l'extraction de l'ADN présentent des efficacités variables, comme cela avait été testé par l'équipe de Huggett^{215,216}.

III.i.2. Aspects technologiques

La qPCR en temps réel est la technique classique de détection de l'ADNtc. Cette méthode permet de détecter de l'ADN muté cible hautement dilué dans un ensemble d'ADN normal avec une sensibilité limitée à 10-20% en qPCR en temps réel classique, et 1-10% dans le cas de tests de qPCR optimisés. Ainsi, de l'ADNtc très faiblement représenté dans un échantillon risquerait de ne pas être détecté dans un volume réactionnel comprenant une quantité importante d'ADN non cible. De tels faux-négatifs ne permettraient pas d'envisager une application clinique, notamment pour la décision thérapeutique ou la détection de maladie résiduelle. Ceci rend indispensable l'utilisation d'outils de détection plus sensibles et plus spécifiques que les techniques conventionnelles (qPCR et séquençage Sanger).

De plus, afin de réaliser un suivi efficace de la quantité d'ADNtc, les méthodes utilisées devraient également permettre une quantification précise de l'ADN total circulant. Des techniques comme la détection par technologie ARMS, le séquençage Sanger ou le pyroséquençage permettent de détecter des cibles avec des sensibilités variables, peu adaptées à la détection de l'ADNtc (**Figure 20**). Les développements récents de la PCR digitale (dPCR) et ses applications en microfluidique de gouttes, permettent aujourd'hui de répondre à ces exigences^{217,218}.



Figure 20. Représentation de la sensibilité des techniques de détection de l'ADN tumoral. Les techniques reposant sur le séquençage Sanger, le pyroséquençage ou encore la PCR quantitative ne permettent pas d'atteindre une sensibilité supérieure à 1%. Le NGS classique peut atteindre une sensibilité de 1-5%. Il existe des implémentations de la qPCR classique avec l'émergence de techniques de détection telles que le système CAST (Competitive Allele Specific TaqMan). Cependant ces techniques restent adaptées à la détection d'ADN cible dans les tissus. Plus récemment la technique Intplex a été décrite, qui permetterait d'atteindre des sensibilités de 0,1 à 0,01%. Les techniques récentes basées sur la PCR digitale (BEAMing, dPCR en gouttes) ont permis d'améliorer encore la sensibilité de détection rendant la quantification de l'ADNtc plus précise. Des optimisations du NGS ont également été développées (TAM-seq, Safe-seq par exemples), adaptées au séquençage de l'ADN plasmatique. Inspiré de Diaz et al.²¹⁹ et Perez-Toralla et al.²¹⁸.

III.ii. De la PCR quantitative à la PCR digitale

La PCR quantitative est actuellement la technique couramment utilisée en clinique pour la détection de mutations dans un échantillon tumoral. La sensibilité limitée de cette technique décrite ci-dessus permet l'analyse d'échantillons tumoraux dans lesquels la proportion de clones mutants est souvent

très élevée, mais reste insuffisante pour la détection de variants rares ou d'ADN tumoral circulant plasmatique. En effet, la PCR classique présente des limitations telles que l'amplification préférentielle de petits fragments, la production de séquences chimériques, la difficulté de détecter des ADN rares, ce qui en fait une technique non adaptée à l'analyse d'échantillons complexes tels que l'ADN plasmatique²¹⁷.

Pour s'affranchir de ces limitations, Sykes *et al.* ont proposé en 1992 «une procédure générale pour la quantification du nombre initial de molécules cibles dans un échantillon, utilisant la dilution limite, la PCR et la loi de Poisson»²²⁰. Cette approche consiste à diluer en série un échantillon afin d'obtenir une dilution limite, où chaque partition contient, au plus, une molécule d'ADN cible. La distribution statistique de l'ADN dans les compartiments est alors donnée par la loi de Poisson, qui régit les statistiques d'événements rares, ce qui permet de retrouver la quantité initiale d'ADN dans l'échantillon testé.

Ce concept a été étendu par Vogelstein et Kinzler²²¹ en 1999 et appliqué au développement d'une nouvelle procédure appelée « PCR digitale » (dPCR) au format microplaque et intégrant une étape de détection avec des sondes fluorescentes (molecular beacons). Les partitions étaient soumises à une amplification par PCR et analysées individuellement. Le signal issu de la détection des séquences minoritaires de l'échantillon est alors mesurable. Chaque compartiment produit ainsi, en fonction de la présence ou non de la molécule d'intérêt, un signal positif ou négatif, d'où le terme de « PCR digitale ». En calculant le rapport du nombre de puits émettant chaque couleur, il devient possible de quantifier la fraction d'ADN muté contenue dans l'échantillon sans avoir besoin de se référer à une courbe de calibration (**Figure 21**).

Ainsi, les évènements rares comme l'ADNtc faiblement représenté peuvent être détectés à l'échelle de la molécule unique dès lors que le nombre de compartiments est suffisamment grand. En effet, la sensibilité de la dPCR dépend principalement du volume d'échantillon et du nombre total de compartiments que l'on peut analyser. Pour une sensibilité maximum, il suffirait donc de multiplier le nombre de compartiments jusqu'à obtenir des décomptes statistiquement fiables²²².

Bien que le principe soit simple, la théorie ne rejoint pas la pratique et l'implémentation des procédures de PCR digitale s'est avérée complexe. L'utilisation de microplaques 384-puits nécessite des volumes importants de réactifs (5µL par réaction). De nouvelles technologies basées sur la miniaturisation et la nanofabrication ont émergé et permis d'optimiser l'efficacité de la dPCR pour l'analyse de l'ADNtc. Ces technologies sont basées sur le contrôle du volume, soit dans des microchambres, soit dans des microgouttelettes aqueuses (PCR digitale en émulsion).



Figure 21. Principe de la PCR digitale en comparaison à la qPCR classique. La qPCR est une technique relative, basée sur la détection d'un signal moyenné sur l'ensemble de l'échantillon. La dilution d'ADN muté (rouge) dans de l'ADN normal (bleu) influence le seuil de détection (Ct). Celui-ci est dépendant de la fréquence de la séquence cible dans l'échantillon, d'où le décalage du nombre de cycles requis pour détecter les cibles diluées (rouge). La compartimentation des ADN cibles en condition de dilution limite permet de détecter les ADN cibles de façon individuelle, ce qui fait de la PCR digitale une technique de quantification absolue. Adapté de Vogelstein, B. and Kinzler KW²²³.

III.iii. Développement de technologies basées sur la PCR digitale : PCR digitale en microchambres

Des micropuces comprenant des microchambres contenant des volumes de l'ordre du nanolitre ont été développées²²⁴. Elles permettent une automatisation des différentes étapes d'analyse mais présentent un nombre de compartiments limité (quelques milliers) afin de minimiser les dimensions des micropuces²²⁵.

Il existe des plateformes utilisant : i) un système de microvannes et celles utilisant des ii) micropuits. Dans les systèmes à microvannes, l'objectif est de manipuler les fluides de manière très contrôlée via des pompes et vannes. Des matériaux élastomères ont notamment été utilisés pour fabriquer des vannes flexibles pour un contrôle optimisé des débits de fluides²²⁶. Des applications en dPCR ont vu le jour suite à l'intégration à grande échelle de ces vannes miniaturisées flexibles²²⁷. Ainsi, un échantillon et les réactifs requis pour la réaction de dPCR peuvent être compartimentés, tel que réalisé dans le système Digital Array Chip 12.765® (Fluidigm, **Figure 22A**) qui peut analyser 12 échantillons différents en parallèle. Chacun est réparti en 765 compartiments fermés d'un volume de 6 nL. Avec cette plateforme, il est donc possible de réaliser 9 180 réactions de PCR simultanées (Biomark[™]HD, Fluidigm). Ce système a été appliqué la détection de l'EGFR muté²²⁸. Il existe un autre système comprenant un plus grand nombre de compartiments pouvant réaliser jusqu'à 36 960 réactions en parallèle dans des volumes de 850 pL (EP1[™], Fluidigm). La sensibilité de détection est

ainsi d'autant plus élevée que le nombre de compartiment est grand. Un système optimisé par Fluidigm, le QuantStudio[™] 12K Flex, permet une analyse de PCR en temps-réel.

Un autre système consiste en une plaque métallique perforée de la taille d'une lame de microscope, comprenant 3072 compartiments de 33 nL traités par un revêtement hydrophile tandis que l'extérieur est hydrophobe. L'échantillon est ainsi isolé dans les différents compartiments de façon à prévenir d'éventuelles contaminations. Ce format a été developpé en un système commercial (OpenArray®, LifeTechnologies/Thermo Fischer scientific) et a démontré son efficacité pour la détection de mutations ponctuelles²²⁹ en temps réel. Une optimisation de ce système par l'augmentation du nombre de compartiments a été réalisée avec la possibilité d'analyser 20 000 partitions (système QuantStudio[™]), au détriment de la mesure de fluorescence en temps réel (**Figure 22C**).

Récemment, un système a été commercialisé (société FormulaTrix) basé sur le couplage d'une microplaque 96 puits sur la face supérieure et de chambres microfluidiques sur la face inférieure. Suite à l'introduction du mélange réactionnel dans le puits, la microplaque est recouverte puis placée dans le tiroir ou se produit la compartimentation pour réaliser la PCR digitale. La répartition dans les compartiments des chambres microfluidiques est réalisée par un système exerçant une pression sur le liquide. Celui-ci entre ainsi dans les canaux, ce qui permet l'isolement des copies individuelles d'ADN dans 496 partitions séparées (**Figure 22B**). Ensuite, la microplaque est déplacée pour permettre la réaction de PCR. La lecture de fluorescence est effectuée par la station d'imagerie de la machine.



Figure 22. Systèmes de PCR digitale en micropuits ou microchambres. A) Digital Array de Fluidigm, B) Quantstudio[™] de Lifetechnologies, C) Constellation de Formulatrix, D) SlipChip, E) Clarity[™]. Tels que décrits dans le texte, ces systèmes sont basés sur la compartimentation en microchambres pour l'isolation des molécules cibles jusqu'à une molécule par puits au maximum (dilution limite). Issu de http://www.fluidigm.com²³⁰, http://formulatrix.com²³¹, https://www.thermofisher.com²³², Perez-Toralla et al²¹⁸, http://www.jnmedsys.com²³³.

Enfin, le système « SlipChip » est un système microfluidique constitué de deux plaques microstructurées mises en contact et séparées par l'intermédiaire d'une fine couche d'huile. Chacune des plaques contient des micropuits qui peuvent être alignés et superposés pour créer un réseau de microcanaux permettant le remplissage du système. Par le simple glissement des plaques entre elles,

les puits peuvent être isolés afin de compartimenter les molécules d'ADN et de les mélanger avec les réactifs nécessaires à la PCR (**Figure 22D**). Ce système a été optimisé pour la détection quantitative en dPCR de molécules uniques d'ADN bactérien²³⁴, permettant d'atteindre une sensibilité de détection d'1 fg/µL d'ADN génomique grâce à un volume faible de réaction (2.6nL) contrebalançant le nombre limité de puits. Le système SlipChip est de faible coût, rendant son utilisation possible dans des milieux aux ressources limitées.

Un nouveau système, appelé Clarity[™] Digital PCR Technology (JN Medsys), repose sur la distribution du mélange réactionnel dans une puce comprenant 10 000 compartiments, positionnée dans un tube (**Figure 22E**). Un système permet d'homogénéiser, de façon automatisée (Clarity[™] auto loader), la répartition du mélange contenant l'échantillon d'ADN dans chaque compartiment dont le volume est de l'ordre du nanolitre. Les tubes sont présentés sous forme de barrettes de 8 tubes de 200 µL (Clarity[™] tube-strip), compatibles avec un appareil de PCR conventionnel. Suite à l'amplification, 4 barrettes de 8 tubes (32 réactions), peuvent être insérées dans un lecteur de fluorescence qui peut de détecter le signal émis dans 2 couleurs.

Certains de ces systèmes présentent l'avantage de pouvoir réaliser le thermocyclage et la lecture des signaux de fluorescence directement dans la même plate-forme, limitant ainsi la manipulation de l'échantillon et donc le risque de contamination de même que le temps d'analyse. La simplicité d'utilisation des plateformes induit en revanche une certaine dépendance aux réactifs commerciaux dans le cas du Digital array® qui peut être pré-chargé en réactifs par exemple. Dans tous les cas de figure, la limitation majeure de ces systèmes est le nombre de compartiments, au regard des développements ultérieurs de dPCR en émulsion.

III.iv. Développement de technologies basées sur la PCR digitale : PCR digitale en émulsion

Cette technique est basée sur l'utilisation de gouttelettes aqueuses dispersées dans de l'huile pour la compartimentation des réactions de PCR. Ainsi, un nombre de compartiments théoriquement illimité est envisageable, dépendant du volume des gouttelettes et de celui de l'échantillon disponible. Ces compartiments contiennent l'ADN cible et le mélange réactionnel nécessaire à la PCR permettant de réaliser une PCR en émulsion ou « ePCR ». Des millions de compartiments peuvent être générés ce qui permet d'atteindre de très bonnes limites de détection. Cette stratégie permet en outre de s'affranchir de la fabrication du support en microchambres, ce qui peut la rendre en théorie moins coûteuse²³⁵.

La production des gouttes était réalisée, dans un premier temps, par agitation mécanique (**Figure 24**). Cela engendrait une polydispersité en tailles de gouttes et donc en volumes réactionnels et limitait l'obtention de résultats quantitatifs. Le gain en sensibilité qu'offre la dPCR était mis en jeu par le risque d'encapsuler plus d'une molécule cible par goutte. En outre, la manipulation des émulsions post-PCR et donc de l'ADN amplifié était laborieuse.

Afin de pallier à ces limitations, le couplage de l'ePCR à l'utilisation de billes magnétiques a été développé. Dans cette technique, l'émulsion est cassée suite à l'amplification PCR, facilitant ainsi la manipulation des copies d'ADN cibles pour les analyses, et les billes magnétiques peuvent être récupérées pour une utilisation ultérieure (**Figure 23**).



Rupture de l'émulsion Récupération des ADN amplifiés sur les billes enrichies en ADN cible

Figure 23. PCR digitale en emulsion basée sur l'utilisation de billes magnétiques. 1) Etape de production de l'émulsion eau-dans-l'huile: les réactifs nécessaires à la réaction de dPCR et l'ADN sont mélangés avec l'huile afin de produire l'émulsion. Chaque goutte contient de l'ADN, le mélange de réactifs PCR, et une bille sur laquelle sont fixés un adaptateur et des amorces spécifiques de la région ciblée. L'étape 2) peut avoir lieu: des cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation du brin d'ADN sont alternés. Ces étapes sont répétées de façon à « recouvrir » la surface de la bille d'amplicons. 3) Les billes sont ensuite extraites de l'émulsion, purifiées, incubées dans une solution contenant des marqueurs fluorescents spécifiques des séquences d'ADN amplifiés. Elles sont analysées par cytométrie en flux (hormis les billes portant des séquences multiples, qui sont éliminées de l'analyse). De cette façon, la sensibilité du BEAMing n'est limitée que par le taux d'erreur de la polymérase utilisée. Modifié de Dressman et al.²³⁶.

Des applications ont été reportées dans la littérature, principalement pour la génération de librairies de séquençage²³⁷. Une stratégie appelée BEAMing (Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics) a été développée sur la base de ce couplage²³⁸, et commercialisée par la société Sysmex Inostics. Ce système utilise des billes magnétiques fonctionnalisées avec des amorces complémentaires de l'ADN cible qui, une fois « recouvertes » de multiples copies de l'ADN cible initialement encapsulé, sont marquées par des fluorochromes et analysées en cytométrie en flux. La première application de cette méthode a été décrite en 2003 pour la détection de variants génétiques²³⁶. La sensibilité de cette technique a permis de détecter une molécule d'ADN mutée parmi 10 000 molécules non mutées²³⁹.

La technique BEAMing a été depuis appliquée à la détection quantitative de mutations *KRAS* dans l'ADN plasmatique chez des patients atteints de cancer colorectal¹⁴⁸ ainsi que pour l'identification des mutations *EGFR* de sensibilité et de résistance dans le cancer du poumon, tel

qu'évoqué précédemment²⁰⁵. Une procédure a été développée sur la base du BEAMing pour la quantification de la méthylation de séquences spécifiques de l'ADN (Methyl-BEAMing). Cette procédure permet de détecter une molécule méthylée du gène de la vimentine parmis environ 5000 molécules d'ADN non méthylées dans des échantillons de plasma ou de fecès¹⁷⁹.

Le paramètre influant sur la sensibilité du BEAMing est principalement le taux d'erreurs générées par la polymérase utilisée lors de la préamplification des séquences d'intérêt. Ainsi, cette technique est très attractive pour la détection de séquences rares.

III.v. Apport de la microfluidique de gouttes : développement de la PCR digitale en gouttelettes

La microfluidique est une technologie fondée sur la manipulation de très faibles quantités de fluides (de 10^{-9} à 10^{-18} L) dans des microcanaux²⁴⁰.

Des systèmes permettent la production haut-débit et hautement monodisperse d'émulsions d'eau dans l'huile grâce à l'utilisation de tensioactifs, molécules stabilisant les gouttes afin qu'elles ne coalescent pas²⁴¹ (**Figure 24**).



Figure 24. Techniques de production de l'émulsion acqueuse et polydispersité: impact sur la capacité d'encapsulation des molécules cibles en condition de dilution limite. Lorsque l'émulsion est formée par agitation mécanique (A) et par extrusion (B), on observe une forte polydispersité des gouttelettes. Cette polydispersité des volumes réactionnels limitait l'obtention de résultats quantitatifs et augmentait le risque d'encapsuler plus d'une molécule cible par goutte. Avec un système microfluidique (B), les gouttelettes sont homogènes, grâce au contrôle permis par l'utilisation de pompes pour le maintien d'un débit constant et l'utilisation de tensioactifs. Les molécules cibles peuvent ainsi être encapsulées dans les gouttelettes de façon à respecter la répartition d'une molécule par goutte, dès lors que le nombre de compartiments est suffisamment élevé. Issu de Mastrobatista, E. et al²⁴²., Frenz et al.²⁴³.

Les gouttes peuvent être manipulées à l'aide de modules microfluidiques permettant la fusion, la division, la collecte, le stockage et autres fonctions (**Figure 25**).



Figure 25. Exemples de modules microfluidiques pour la manipulation des gouttes. Ces modules peuvent permettre la production, l'incubation et encore d'autres fonctions présentées ci-dessus, grâce à la mise au point de systèmes microfluidiques. Issu de Taly et al.²¹⁷.

Cette technologie a été utilisée pour la réalisation de réactions de PCR digitale en microgouttelettes²¹⁷. Les gouttes, équivalentes à des « microréacteurs », peuvent ensuite être stockées en attendant d'être thermocyclées ou encore manipulées à l'aide de plateformes microfluidiques (fusion, division, tri). La figure suivante représente la production d'une émulsion par système microfluidique pour la réalisation d'une dPCR en gouttelette (**Figure 26**).



Figure 26. Shéma de production de gouttes par microfluidique pour la réalisation d'une réaction de dPCR en gouttelettes. L'ADN à tester est mélangé aux réactifs nécessaires à la réalisation de la PCR. Cette solution aqueuse est injectée dans un canal microfluidique, permettant l'entrée d'huile par deux canaux perpendiculaires au premier. Le fluide aqueux contenant l'ADN est injecté à une certaine fréquence de même que l'huile qui cisaille le mélange. Ce cisaillement permet la production de gouttes, qui sont stabilisées à l'aide d'un tensioactif. La production de plusieurs milliers à millions de gouttes permet d'encapsuler une molécule d'ADN cible par goutte.

Un autre système d'analyse dynamique a été décrit par Kiss *et al.*, offrant la possibilité de lire le signal de fluorescence en flux continu²⁴⁴. Dans cette configuration, les auteurs décrivent la détection d'une gouttelette émettant de la fluorescence (donc une molécule d'ADN cible) toutes les 167 gouttelettes. Ce système permet de conserver l'intégrité des gouttes mais est cependant limité par l'étape de calibration qui nécessite l'ajustement du programme PCR, non maniable une fois la conception de la puce réalisée.

Le débit d'analyse est réduit en raison du nombre limité de gouttes analysables. En effet, plus il y a de compartiment, plus la probabilité de détecter individuellement chaque ADN cible, potentiellement rare, est grande. Afin d'augmenter le nombre de gouttes produits, et par la même la sensibilité de détection, des systèmes microfluidiques permettant de collecter des gouttes hors puce ont été créées, qui sont ensuite thermocyclées dans un appareil de PCR conventionnel^{210,245}.

Afin de tirer parti de cette technique, la détection des ADN cibles par fluorescence a été implémentée à partir des techniques existantes en qPCR, comme les sondes fluorescentes ou les molécules s'intercalant dans l'ADN.

Dans ces systèmes, une première puce microfluidique produisait l'émulsion aqueuse contenant l'échantillon d'ADN à tester en présence de deux sondes de détection TaqMan®, émettant des signaux de fluorescence vert ou rouge, ciblant spécifiquement de l'ADN muté ou de l'ADN non muté²¹⁰. Puis une collecte de l'émulsion était faite afin de réaliser un thermocyclage hors puce. Enfin, une seconde puce microfluidique permettait le passage de chaque goutte devant un faisceau laser pour la détection du signal de fluorescence (**Figure 27**).



Figure 27. Système de microfluidique de gouttes pour la réalisation d'une dPCR d'après le système décrit par Pekin D.²¹⁷. Ce système permet la production des gouttelettes contenant l'ADN génomique à tester, les sondes de détection TagMan® ciblant l'ADN muté (rouge) ou l'ADN normal (vert). L'émulsion est ensuite collectée et thermocyclée dans un appareil de PCR conventionnel. Suite à l'amplification de PCR hors puce, l'émulsion est réinjectée dans un système microfluidique dédié à la lecture de fluorescence par faisceau laser. Les gouttes contenant de l'ADN muté émettent de la fluorescence rouge, tandis que les gouttes contenant de l'ADN normal émettent une fluorescence verte. Issu de Taly et al.²¹⁷.

Des gouttes de quelques picolitres ont été générées dans un autre sysème, offrant la possibilité de manipuler plusieurs millions de gouttes à haute fréquence (kHz), comme dans le travail de Pekin et collaborateurs décrit ci-dessus (Figure 27). Ce système a démontré la possibilité d'atteindre une sensibilité de détection de 1 ADN cible (muté) parmi 200 000 ADN non mutés²¹⁰. Un tel système a été commercialisé par la société Raindance Technologies (RainDrop) (Figure 28). Depuis, de nombreuses applications ont été décrites, notamment pour la détection de mutations rares dans différents types de cancers^{143,246}.

Instrument RainDance Technologies: systèmes Raindrop

1) Chargement de l'échantillon et disposition de la puce dans le RainDrop: production de l'émulsion, plusieurs millions de pico-gouttelettes sont produites. séquences cibles par 8 émulsions sont générées en parallèle (8 échantillons compartimentés).



2) Amplification des réaction PCR.

12



 Réinjection dans une seconde puce et lecture du signal de fluorescence. Analyse des populations ciblées: séquences mutées et normales par exemple en vert et rouge respectivement, et population de gouttes ne comprenant pas d'ADN cible (bleue). 4) Le logiciel Raindrop Analyst permet d'analyser les résultats de lecture de fluorescence.



Figure 28. Description des étapes d'analyse du système de PCR digitale en gouttelettes commercialisé par Raindance Technologies[™].

Un autre système a été commercialisé, par la société Bio-Rad (ddPCR[™]) (**Figure 29**), qui repose sur la production d'émulsions dont le volume des gouttes est de l'ordre du nanolitre. Une application de la détection de mutation du gène *BRAF* a permis une sensibilité de 1/100 000²²². Les auteurs ont également appliqué ce système de PCR digitale en gouttelettes à la détection d'ADN fœtal dans le plasma maternel^{247,248} ou encore d'ADN viral²⁴⁹.

Instrument Bio-Rad Technologies - QX200[™] Droplet Digital[™] (ddPCR[™])

1) Une cartouche est chargée en échantillons (n=8) et en huile pour la production de gouttes dans le Droplet Generator (N=20 000). 2) Amplification des séquences cibles par réaction PCR.



3) Suite au thermocyclage, les gouttelettes sont pipettées par l'opérateur pour les transférer vers une plaque 96 puits à disposer dans le « Droplet Reader ». Le signal de fluorescence est lu par la machine.

4) Le logiciel QuantaSoft™ permet d'analyser les populations associées à différentes émissions de fluorescence.



Figure 29. Description des étapes d'analyse du système de PCR digitale en gouttelettes commercialisé par Bio-Rad Technologies.

Un nouveau système de PCR digitale en gouttes est commercialisé par la société STILLA Technologies (Naica[™], **Figure 30**). Ce système génère 25 000 à 30 000 gouttelettes et permet la détection de trois couleurs différentes, donnant la possibilité de quantifier trois couleurs de fluorescence. Le thermocyclage est intégré dans le système, réduisant à environ 2 heures le temps d'analyse. Cette technologie est basée sur une lecture par microscopie grâce au logiciel qui permettrait de discriminer avec précision les cibles des faux positifs. A ce jour, aucun travail de recherche n'a encore décrit l'utilisation de cette technologie, récemment commercialisée. Dans la documentation de la société, un test ciblant les mutations p.L858R, p.L861Q et p.T790M ainsi qu'une séquence non mutée du gène EGFR a été décrit²⁵⁰. La sensibilité de détection obtenue est de 0.25 copies/µL du gène EGFR muté (0.05%).

Système STILLA Technologies – Instrument Naica™

1) Préparation de la puce: chargement de 4 échantillons.

2) Génération de l'émulsion: 25000 à 30000 gouttes de 430 pL. L'amplification PCR est réalisée par thermocyclage intégré dans le système « Naica Geode ».

A noter que 3 puces peuvent être placées dans l'appareil (12 échantillons).



3) Lecture de la fluorescence: appareil « Naica Prism ». Trois couleurs de détection peuvent être lues.

12 échantillons peuvent être analysés, comme dans l'instrument « Geode ». La lecture d'un échantillon dure 1'15". Au total, Stilla Technologies décrit une analyse de 2 heures environ.



Figure 30. Description des étapes d'analyse du système commercialisé par STILLA Technologies.

Le **Tableau 4** présente un comparatif des trois technologies de PCR digitale en gouttelettes commercialisées à ce jour.

Société	Nom du système	Échantillons analysables	Nombre et volume des gouttes	Manipulation des gouttelettes	Détection multiplex
Bio-Rad Technologies	QX200 ™ Droplet Digital ™ (ddPCR™)	N=8 par cartouche (20 μL par puits); 1-6 μL d'échantillon/puits	Jusqu'à 20 000 gouttes Volume de 1 nL	oui	Jusqu'à 5 cibles* Hindson et al., Analytical Chemistry, 2011 McDermott et al., Analytical Chemistry, 2013 Perider et al., PLOS ONE, 2015
RainDance Technologies™	RainDrop®	N=8 par puce (25 μL ou plus jusqu'à 50 μL); 1-18 μL d'échantillon/puits	5 000 000 à 10 000 000 Volume de 5 pL	non	Jusqu'à 10 cibles Zhong et al., Lab On a Chip, 2011 Didelot et al., Clinical Chemistry, 2013 Taly et al., Clinical Chemistry, 2013
STILLA Technologies	Naica™	N=4 par puce 1-8 μL d'échantillon/puits	25 000 à 30 000 gouttes Volume de 430 pL	non	4 cibles détectables** (aucune publication à ce jour, http://www.stilla.fr)

Tableau 3. Comparatif des 3 technologies de PCR digitale en gouttelettes commercialisées par Bio-Rad Technologies, Raindance Technologies, et STILLA Technologies. Adapté de Baker M., Nature Methods, 2012 et données issues du site internet de la société STILLA²⁵⁰ (pas de publication à ce jour). *: certaines publications présentent plusieurs panels de détection atteignant plus de 5 cibles, avec la présence de populations doubles (co-encapsulation); **: 4 cibles ont été détectées, d'après la documentation du site de STILLA Technologies²⁵⁰.

III.vi. Optimisations de la PCR digitale en gouttelettes : détection multiplex

La détection simultanée de plusieurs mutations somatiques en une seule expérience est devenue possible en couplant la PCR digitale en gouttelettes à un système de discrimination par fluorescence.

Pender A. et al. ont développé un multiplex avec le système Bio-Rad, ciblant trois mutations

fréquentes de *KRAS* dans le cancer du poumon. Les auteurs ont décrit une sensibilité de détection d'une molécule d'ADN mutée parmi 2 000 non mutées²⁵¹.

En utilisant la PCR digitale en gouttelettes de quelques picolitres, Pekin *et al.* ont développé une méthode qui a permis de tester un échantillon pour la présence de différentes mutations *KRAS*. Ce test est basé sur l'utilisation d'un fluorophore et d'un code couleur basé sur la variation en intensité de fluorescence²¹⁰. Jusqu'à 6 mutations de l'oncogène *KRAS* ont été détectées en une seule expérience. Le système consistait en la fusion de gouttelettes contenant l'ADN génomique à tester, et de gouttelettes contenant chacune une concentration donnée d'un code fluorescent et de réactifs nécessaires pour la réaction de PCR (**Figure 31A**). Chaque concentration de code était attribuée à l'une parmis six mutations *KRAS* ou à la séquence non mutée²¹⁰. Par ce système de fusion des gouttelettes contenant l'ADN à tester et de celles contenant le codage couleur, chaque ADN génomique était testé pour la présence de l'une des 6 mutations uniquement.



Figure 31. Détection multiplex par le couplage de la microfluidique de gouttes et de sondes de détection par fluorescence de l'ADN. Principe du multiplexage : A) utilisation d'un code de couleur : les sondes de détection TaqMan® sont encapsulées en faisant varier leur concentration, chaque type de goutte (A/B/C/D/E/F/G) contient une concentration différente de fluorescence verte. Une seconde émulsion est générée avec les ADN génomiques à tester pour la présence de l'une des 6 mutations KRAS du codon 12, ou d'une séquence référence (non mutée) du gène KRAS. Les ADN sont encapsulés avec les réactifs de PCR comprenant les sondes ciblant. Les deux émulsions sont ensuite fusionnées et thermocyclées, afin d'amplifier l'ADN cible s'il est présent. L'émulsion est finalement réinjectée dans une puce qui permet la lecture de l'intensité de fluorescence et l'obtention du graphe représenté. Issu de Pekin et al.²⁴⁵. B) Utilisation d'un système à deux couleurs de détection de fluorescence, chaque sonde est présente dans le mélange réactionnel, permettant de tester la présence des 4 cibles en une expérience en faisant varier la concentration en sondes. Issu de Zhong et al.²⁴⁵

Une autre stratégie est basée sur l'utilisation de concentrations différentes de sondes de deux couleurs de fluorescence (**Figure 31B**). Cette application a permis la détection des 7 mutations fréquentes du gène *KRAS* dans l'ADN plasmatique de patients atteints de cancer colorectal (2 panels comprenant chacun 3 ou 4 cibles mutées et 1 séquence de référence). La fraction d'ADN muté déterminée par cette détection multiplex était corrélée à celle déterminée en utilisant un test de détection duplex (2 cibles correspondant à une cible mutée et à la séquence de référence non mutée), démontrant ainsi la spécificité et la sensibilité du test multiplex²⁵².

Ce ciblage multiplex a été appliqué à la détection d'ADN tumoral circulant chez des patients atteints de cancer colorectal avancé, ainsi qu'à la détection de clones rares présents au sein de tissus tumoraux^{143,252}.

Un multiplexage (5-plex) basé sur ce sysème a été développé par Zhong *et al.* pour la détection du nombre de copies de 2 gènes et d'un polymorphisme sur un seul nucléotide dans le syndrome d'atrophie spinale musculaire²⁴⁵.

Un autre type de rapporteur fluorescent a été utilisé pour le multiplexage ; son principe est basé sur l'utilisation d'un intercalant de l'ADN, et d'amorces amplifiant des cibles de tailles différentes²⁵³. Une autre méthode consiste en la variation de la concentration en amorces utilisées pour la détection d'une séquence donnée. Ces systèmes sont représentés dans la figure ci-dessous (**Figure 32**).

Miotke *et al.* ont développé un test basé sur cette stratégie²⁵⁴, en faisant varier la taille des amplicons cibles et de la séquence référence. Ils ont pu atteindre une limite de détection de 1% pour la quantification i) de la mutation BRAF p.V600E ou ii) de la variation du nombre de copies du gène *FLT3* dans des lignées cancéreuses.



Figure 32. Détection multiplex en PCR digitale en gouttelettes utilisant un intercalant fluorescent de l'ADN. Le système est basé sur la variation de la taille de l'amplicon produit (A) ou de la concentration en amorces (B). L'utilisation d'une amorce sens stable et d'une amorce antisens située à une localisation variable permet de générer des amplicons de tailles différentes. Ainsi, la quantité de molécules fluorescentes s'intercalant dans l'ADN augmente lorsque la séquence est plus grande, générant des populations dont l'intensité de fluorescence est plus élevée (XXbp>Xbp). (B) La concentration en amorces est plus élevée pour l'amplification de la séquence A (C2>C1), afin de séparer les populations A et B. Modifié de McDermott et al²⁵³ et Miotke et al.²⁵⁴.

Dans diverses études la PCR digitale a été utilisée pour le suivi de l'ADNtc dans le sang, suite à l'analyse par séquençage de la tumeur pour l'identification d'une ou plusieurs altérations génétiques^{142,203}. Être capable de suivre efficacement les mutations dans les régions fréquemment mutées de l'ADN et ce, sans connaissance préalable du génotype de la tumeur serait, cependant bénéfique pour les patients. Ceci permettrait à la fois de s'affranchir de la conception de tests ciblés pour chaque patient et de tester des patients lorsque les échantillons de tumeur ne sont pas disponibles ou non accessibles. Pour les patients atteints de cancer colorectal, les régions d'intérêt comprennent, entre autres, les codons 12 et 13 de l'exon 2 de l'oncogène *KRAS* (prédictives de la

non-réponse aux traitements anti-EGFR) ou des régions fréquemment mutées de gènes suppresseur de tumeurs *TP53* ou *APC*.

Une technique appelée COLD-PCR²⁵⁵ a été développée, basée sur l'amplification préférentielle des séquences mutées, et l'inhibition de l'amplification de séquences non-mutées. Ceci est rendu possible par l'identification d'une température dite « critique » à laquelle seule la liaison entre le nucléotide muté du brin d'ADN avec l'autre brin sera déstabilisée. Ainsi, les séquences mutées sont dénaturées plus facilement que les séquences non-mutées, et amplifiées par PCR. Cela permet d'obtenir un ratio muté sur non muté plus faible, et donc une meilleure sensibilité de détection.

Une optimisation de la COLD-PCR a permis le ciblage multiple de mutations à l'aide de sondes fluorescentes²⁵⁶. En effet, en ciblant une séquence plus grande et à une localisation où des mutations sont souvent identifiées, il devient possible de détecter la présence d'au moins l'une de ces mutations.

Cette méthode a été adaptée en PCR digitale en gouttelettes appelée « ddCOLD-PCR »²⁵⁷. Une séquence de plusieurs dizaines de paires de bases a ainsi pu être "scannée" pour la présence de mutations de différents nucléotides sur les gènes *TP53* (4 mutations sur l'exon 8) avec une sensibilité de l'ordre de 1%.

III.vii. Détermination de la spécificité et de la sensibilité des tests de PCR digitale en gouttelettes

La PCR digitale en gouttelettes offre un large panel de tests qui peuvent être implémentés en optimisant la sensibilité et la spécificité, afin de proposer des applications adaptées à l'analyse d'échantillons cliniques. Cependant, pour ce faire, il serait nécessaire d'harmoniser les pratiques interlaboratoires.

Des recommandations ont à cet effet été publiées par l'équipe de Huggett. Il s'agit d'une adaptation des "MIQE", "minimum information for publication of Quantitative Real-time PCR experiments", qui visaient déjà à encourager la transparence scientifique concernant les expériences de PCR quantitative en temps réel. Les « digital MIQE », recommandations pour la PCR digitale²⁵⁸, ont également pour but de diffuser les bonnes pratiques d'utilisation afin de faciliter la répétabilité de ces expériences.

En plus de ces recommandations, il faut pouvoir garantir la spécificité et la sensibilité des tests utilisés. Lorsque la quantité de mutations est évaluée dans un échantillon, il est nécessaire de distinguer un « faux positif » d'un échantillon muté. Partant de l'hypothèse que les faux positifs suivaient la même distribution (Loi de Poisson) que les évènements positifs, une méthode de calcul permet la détermination d'une valeur (λ_{FP}) par extrapolation, telle que décrite par Milbury *et al.*²⁵⁹. Le calcul d'une valeur p répondant à un certain intervalle de confiance, définie par l'utilisateur, permet de déduire si l'échantillon est significativement différent du contrôle négatif. Ainsi, un seuil ou limite de blanc « LOB » (limit of blank) peut être calculé à partir de ce λ_{FP} permettant d'attester de la positivité d'un échantillon. La LOB peut être influencée par la taille et la forme des populations de gouttelettes positives. Plus le diamètre du cercle délimitant une population positive sera grand, plus le risque de détecter de faux positifs peut être augmenté. La **Figure 33** correspond à un graphique de

représentation des résultats de PCR digitale en gouttelettes pour la détermination des populations positives.

Une limite de détection (LOD) peut ensuite être déterminée. La LOD concerne la sensibilité du test, elle est estimée en faisant des dilutions en série. Plus un échantillon est riche en ADN total, plus la sensibilité du test est grande. En effet, une détection avec un seuil de sensibilité à 1/100 ne requière pas la même quantité d'ADN qu'une sensibilité de 1/10 000. Ainsi, il est de la responsabilité de l'utilisateur de déterminer la quantité d'ADN requise pour atteindre la sensibilité désirée. Dans leur article, les auteurs définissent le calcul de la LOD, dépendante de la LOB dès lors que le nombre de positifs doit être supérieur à celui des faux positifs. Dans leur article, les auteurs ont comparé les LOD de différents tests ciblant deux mutations du gène *EGFR*. En outre, d'après leurs observations, les auteurs recommandent d'évaluer la sensibilité et la spécificité des tests sur des échantillons déjà bien caractérisés afin de déterminer quel test est le plus précis.



Figure 33. Exemple de détermination des populations positives pour la mutation EGFR p.L858R par l'analyse de PCR digitale en gouttelettes. (*A*) contrôlé négatif (pas de population mutante) et (*B*) échantillon positif pour la mutation EGFR L858R analysés en PCR digitale en gouttelettes. Les populations non mutantes (axe d'intensité de fluorescence VIC) et mutantes (axe d'intensité de fluorescence FAM) doivent être délimitées lors de l'analyse. Lorsque la population sélectionnée est définie par un grand cercle/une grande ellipse (ou « clusters »), le risque d'inclure plus de faux positifs est augmenté, tandis que de plus petits cercles ou ellipses limiteront la quantité de faux positifs pris en compte dans l'analyse²⁵⁹. Issu de Milbury et al.²⁵⁹.

IV. Applications de la PCR digitale en gouttelettes à la détection biomarqueurs circulants

IV.i. Apport de la PCR digitale en gouttelettes pour l'analyse d'échantillons biologiques

Comme nous l'avons vu précédemment, la PCR digitale en gouttelettes est adaptée à la détection quantitative de molécules rares. Des applications ont vu le jour avec le test du diagnostic prénatal, les maladies infectieuses et l'oncologie^{260,261}. Il est en effet possible de quantifier l'ADNtc, avec une sensibilité permettant de détecter des quantités infimes de molécules cibles diluées dans de l'ADN normal. Cette technique répond ainsi à la problématique technique évoquée en **III.i.1**.

Concernant les enjeux biologiques, la complexité des échantillons issus de biopsies liquides peut présenter un challenge. En effet, les biofluides sont riches en molécules diverses dont certaines sont inhibitrices de la réaction de PCR. En outre, les échantillons cliniques requièrent un conditionnement spécifique notamment pour le stockage avec les tubes EDTA, majoritairement utilisés en clinique. Or l'EDTA, l'héparine, ou encore le SDS sont des molécules pouvant interférer lors de la PCR. La PCR digitale en gouttelettes, par le nombre élevé de compartiments qu'elle génère, permet de diluer hautement ces molécules, s'affranchissant partiellement ou totalement de leur action au contraire de la PCR quantitative en temps réel²⁶². De même, dans le cas de l'analyse de fèces, une dilution est normalement requise avant de procéder à la qPCR. Il a été décrit que la PCR digitale en gouttelettes permet de s'affranchir d'une telle manipulation pré-analytique, sans que cela n'altère la qualité des résultats²⁶³. Ainsi, la PCR digitale en gouttelettes se positionne comme une alternative naturelle à la PCR quantitative en temps-réel pour l'analyse d'échantillons cliniques.

La faisabilité de la détection de l'ADNtc a été démontrée au travers de nombreuses études. L'apport en sensibilité de la PCR digitale en gouttelettes permet la quantification de marqueurs génétiques dans le sang pour la détection de maladie résiduelle, la présence de rares sous-clones rares de résistance présents dans l'ADNtc et le suivi des variations d'ADNtc. Dans cette dernière partie sont présentées des applications de la PCR digitale en gouttelettes relatives au suivi de l'ADNtc et au couplage au séquençage de nouvelle génération (NGS).

IV.ii. Sensibilité de la détection d'ADNtc par PCR digitale en gouttelettes

En terme de sensibilité biologique et technique, la détection d'ADNtc par PCR digitale en gouttelettes s'avère être hautement corrélée à l'analyse de tissus. Une étude a comparé les résultats de génotypage des tumeurs à ceux d'analyses de l'ADNtc par des panels multiplex ciblant les 7 mutations les plus fréquentes de *KRAS* chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique²⁵². Parmi les patients dont la tumeur présentait une mutation *KRAS*, dans 14 échantillons d'ADN plasmatiques sur 19 la mutation a été retrouvée tandis que dans 1 cas une autre mutation de *KRAS* a été détectée et dans 4 autres cas aucune des mutations n'étaient identifiées en multiplex. Dans ces 4 cas, 2 ont été détectées en duplex, en raison de la sensibilité supérieure de ce test en comparaison au multiplex. Parmi les patients dont les tumeurs étaient négatives pour l'une des mutations *KRAS*, 2 cas présentaient de l'ADN plasmatique muté *KRAS*. Chez 5 patients dont la tumeur était mutée *BRAF* p.V600E, l'ADNtc était aussi positif pour cette mutation. Une concordance de 92% a été décrite entre les résultats sur tissus et ceux d'analyse de l'ADNtc. Ces résultats démontrent l'intérêt de la sensibilité du test de l'ADN circulant par PCR digitale en gouttelettes en complément des génotypages sur ADN de tissus, ce qui a été confirmé dans plusieurs autres études^{143,252}.

Dans une étude portant sur le cancer du sein, le statut mutationnel du gène *PIK3CA* a été déterminé dans les tissus de pièce opératoire par séquençage Sanger, ainsi que dans l'ADN plasmatique pré- et post-chirurgie par PCR digitale en gouttelettes²⁶⁴. Chez 5 patientes, le tissu tumoral n'était pas muté d'après l'analyse Sanger, tandis qu'une mutation a été détectée par PCR digitale en gouttelettes. Ceci met en évidence la sensibilité de la technique de PCR digitale en

67

gouttelettes (<0.001%) en comparaison au séquençage Sanger (1-10%)²¹⁹. Les mutations identifiées dans le tissu tumoral ont été retrouvées dans l'ADNtc des patientes présentant une mutation avec une concordance de 93.3%.

Chez des patients atteints de mélanome avancé, une concordance de 84.3% a été observée entre l'ADN tumoral provenant du tissu et l'ADNtc²⁶⁵. Cette sensibilité de détection ouvre également la voie à la quantification hautement précise de l'ADNtc dans des cas où il est particulièrement rare (maladie résiduelle, détection précoce de la récurrence).

IV.iii. Détection de l'ADNtc dans le cas de cancers précoces, enjeu prédictif

Les premiers résultats démontrant la faisabilité de détecter de l'ADNtc ont été réalisés chez des patients dont la maladie était avancée, générant une libération d'ADNtc plus importante due à la forte masse tumorale¹⁶². Cependant, un intérêt majeur de la PCR digitale en gouttelettes étant sa haute sensibilité, cette technique favorise la possibilité de détecter précocement un échappement au traitement ou encore une maladie résiduelle post-chirurgie dans le cas de cancers précoces.

Dans l'étude portant sur le cancer du sein mentionnée précédemment²⁶⁴, l'ADN plasmatique pré- et post-chirurgie a été analysé par PCR digitale en gouttelettes afin de détecter l'impact de la présence d'ADNtc post-chirurgie. Parmis les patientes dont l'ADNtc était muté *PIK3CA* avant la chirugie, l'ADN plasmatique post-chirurgie a été analysé dans 10 cas, et pour 5 d'entre elles, de l'ADNtc était détectable. Parmis ces 5 patientes, seulement une patiente a présenté une récidive après la chirurgie au moment de la publication. Il s'agit aussi de la patiente dont la fraction d'ADNtc était la plus élevée avant la chirurgie. Une telle étude devrait être reconduite sur une cohorte de plus grand effectif afin de mesurer l'impact pronostique de la « maladie résiduelle ».

Dans le but de détecter précocement l'apparition de métastases chez des patientes atteintes de cancer du sein²⁶⁶, une étude consistait en la collecte d'échantillons sanguins au cours du suivi clinique. Les réarrangements génétiques identifiés par séquençage (Whole Exome Sequencing) ont été ciblés par PCR digitale en gouttelettes dans l'ADN plasmatique après le traitement par chirurgie. La récidive a pu être détectée par l'analyse de l'ADNtc 11 mois en moyenne précédant la détection clinique, dans 86% des cas ayant présenté une rechute. En revanche, une survie sans progression a été observée sur le long terme chez les patients dont l'ADNtc était négatif après la chirurgie.

Chez des patients atteints de cancer colorectal, un suivi longitudinal a été réalisé avec un grand nombre d'échantillons collectés (plus de 150 plasmas au total pour 11 patients)²⁶⁷. Une récidive a été observée dans 6 cas sur 11, 10 mois en moyenne avant la détection par les outils cliniques conventionnels.

IV.iv. Suivi de la masse tumorale

La question de la représentativité de la masse tumorale par la quantité d'ADNtc détectable a été étudiée dans plusieurs travaux.

Dans le mélanome, l'évaluation de la masse tumorale est souvent délicate en raison de la localisation des métastases, souvent cérébrales, ou l'invasion des ganglions lymphatiques, de mauvais pronostique précédent l'apparition de métastases. La détection de l'ADNtc a été démontrée

dans plusieurs études portant sur ce type de cancer^{68,265}. En outre, devant le nombre restreint de mutations à ce jour identifiées dans le mélanome et utilisées pour le choix de la thérapie ciblée (plus de 90% des patients mutés BRAF p.V600E/K et NRAS p.Q61R/H/K, 70-80% mutés BRAF p.V600E²⁶⁸), il serait intéressant de disposer d'un test non invasif pour déterminer le statut mutationnel du patient au cours de son suivi.

Etant donné la fréquence de la mutation *BRAF* p.V600E dans le mélanome²⁶⁹, des études ont comparé l'unique marqueur pronostique biologique approuvé cliniquement, le LDH, à la mesure de l'ADNtc plasmatique par PCR digitale en gouttelettes. Une étude de cas portant sur 6 patients a suggéré que la quantification de l'ADNtc chez des patients atteints de cancer de stade IV, la quantification au cours du suivi de l'ADNtc était cohérente avec le dosage en LDH bien que plus précise dans l'évaluation de la progression, en particulier chez 2 patients⁶⁸. En effet, lorsque le LDH et l'ADNtc présentaient les mêmes variations, le dosage en LDH était décalé dans le temps par rapport à l'ADNtc, dont les variations de concentration étaient plus précoces.

Une autre étude a mesuré l'ADNtc plasmatique chez 20 patients atteints d'un mélanome métastatique dans le cadre de la thérapie anti-BRAF mutée (vemurafenib)²⁶⁵. Des échantillons étaient collectés avant traitement, à un mois de traitement, au point de meilleure réponse tumorale, et au moment de la progression. La quantité d'ADNtc était corrélée à la réponse tumorale ainsi qu'à la survie.

IV.v. Apport de la PCR digitale en gouttelettes pour la détection de l'ADNtc dans d'autres biofluides

Peu d'études ont exploré le potentiel d'autres biofluides notamment l'urine pour la détection de l'ADNtc par PCR digitale en gouttelettes. La détection dans l'urine d'ADNtc présente plusieurs avantages en plus d'être non invasive, en particulier chez des patients pour lesquels les prélèvements sanguins sont difficiles à réaliser, elle est une source d'ADN circulant facilitant les prélèvements répétés. En outre, de tels échantillons présentent un intérêt en raison de la facilité de suivi des patients, étant facilement collectés.

En effet, certaines études décrivent des quantités non négligeables d'ADNtc dans les urines²⁷⁰. Par exemple dans une étude sur le cancer colorectal des concentrations en ADN total variant de 40 à 100 ng/mL d'urine ont été reportées²⁷¹. Dans le cancer de la vessie, une étude a utilisé la PCR digitale en gouttelettes pour la détection d'altérations dans les urines des patients, en comparaison aux analyses d'ADN extrait de plasma. De façon intéressante, les concentrations en ADNtc plasmatiques variaient de 0 à 120 copies/mL, et de 0 à 812 copies/mL dans les urines²⁷².

Dans un type particulier de cancer, l'histiocytose²⁷³, il est délicat de déterminer le statut mutationnel des patients pouvant bénéficier de thérapie ciblant BRAF p.V600E, en raison de la complexité du tissu tumoral et de la proportion faible d'histiocytes. Janku *et al.* ont mesuré l'ADNtc issu de plasma et d'urine par PCR digitale en gouttelettes chez des patients atteints du syndrome d'Erheim-Chester, un type particulier d'histiocytose (non langerhansienne)²⁷⁴. Dans la moitié des cas (3/6 patients), l'ADNtc était détecté dans le plasma et l'urine. Dans les 3 autres cas, l'ADNtc était détectable soit dans le plasma, soit dans l'urine.

Une autre étude incluant plus de patients (N=30) a démontré la possibilité de quantifier l'ADN muté BRAF p.V600E dans l'urine de patients atteints d'histiocytose langerhansienne ou de syndrome d'Erdheim-Chester²⁷⁵. Une concordance de 100% était observée pour la présence de la mutation dans l'ADN extrait de tissu et l'ADNtc issu d'urine.

IV.vi. Application à la détection de biomarqueurs émergents

Dans la partie « Application de la détection l'ADNtc à de nouvelles altérations: vers de nouveaux marqueurs circulants spécifiques de la tumeur » (II., les réarrangements chromosomiques, le niveau de méthylation ou encore l'intégrité de l'ADNtc ont été décrits. Des tests utilisant la PCR digitale en gouttelettes ont vu le jour, permettant de cibler dans les biopsies liquides ces différentes altérations spécifiques de la tumeur, comme représenté dans la **Figure 34**.

IV.vi.1. Réarrangements et variations du nombre de copies de gènes

Des mécanismes de résistances acquises ou *de novo* ont été identifiés chez des patients atteints de divers types de cancers et traités par un inhibiteur de kinase MET²⁷⁶. Des amplifications concomitantes de plusieurs gènes seraient liées à ces résistances au traitement²⁷⁷. Le suivi du nombre de copies de *MET* et *EGFR* a été réalisé par un test de PCR digitale en gouttelettes chez un patient, suite à l'identification en méthode FISH dans le tissu tumoral d'une amplification de *MET*. Celle-ci a diminué au cours du traitement, suite à une réponse tandis qu'une amplification de l'EGFR préexistait, bien que non détectée dans la tumeur. Dans une autre étude portant sur le cancer de l'estomac démontre la détection d'un ratio élevé de copies du gène *HER2* à la récidive (en comparaison à un gène référence)²⁷⁸. En outre, tandis que ces ratios élevés n'étaient pas détectés chez des patients dits *HER2* négatifs au moment de l'opération, les ratios ont augmentés de façon corrélée à la récidive.

IV.vi.2. Méthylation de l'ADNtc

Peu d'études portent sur la détection par PCR digitale en gouttelette de l'hyperméthylation de séquences promotrices de gènes, pourtant souvent décrite dans le processus d'oncogenèse.

La méthylation du gène MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) détectée par Methyl-BEAMing dans l'ADNtc plasmatique de patients atteints de gliomes ou de cancer colorectal, a été associée à un meilleur pronostique²⁷⁹.

Une étude récente a comparé la sensibilité de détection d'allèles peu fréquemment méthylés par les méthodes de PCR conventionnelle et de ddPCR (système Bio-Rad) en utilisant le kit de détection MethyLight²⁸⁰. Les auteurs démontrent la possibilité de distinguer la méthylation mono- ou bi-allèlique du gène MLH1 chez des patients atteints de cancer colorectal.

Au cours de ce projet de thèse, la méthylation de gènes spécifiques du cancer colorectal a été ciblée dans l'ADNtc. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication figurant dans la suite du manuscrit²⁸¹.

IV.vi.3. Intégrité de l'ADNtc

L'intégrité de l'ADN circulant a été extensivement explorée par la détermination des ratios de taille (DNA Integrity Index, DII) de séquences répétées (ALU, LINE1)^{193,282}. Récemment ont été décrits des tests évaluant la taille des fragments d'ADNtc tout en ciblant une altération génétique spécifique de la tumeur^{168,193,199}. Cependant, il n'existe à ce jour aucun test dédié à l'évaluation de l'intégrité de l'ADNtc en PCR digitale. Devant la discordance des résultats décrits dans la littérature, il serait intéressant de disposer de tests sensibles permettant une détermination précise de l'intégrité de l'ADNtc.

V. Couplage de la PCR digitale au séquençage nouvelle génération (NGS) pour la détection précise de biomarqueurs

V.i. Le séquençage nouvelle génération

V.i.1. Bref historique

Le séquençage est apparu dans les années 1970, avec l'approche de Sanger qui repose sur la synthèse enzymatique sélective, et celle de Maxam et Gilbert est une méthode par dégradation chimique sélective. De façon analogue dans ces deux techniques, les produits des différentes réactions sont séparés par électrophorèse et analysés pour reconstituer la séquence de l'ADN.

Suite à la naissance de ces techniques, le séquençage du génome entier a émergé grâce à deux approches combinant la biologie moléculaire aux analyses informatiques. Elles sont dites « d'ordonnancement hiérarchique » et « globale » ou « shotgun ». Elles diffèrent en ce que la première classe les fragments génomiques avant séquençage, tandis que la seconde repose sur l'utilisation d'un « assembleur » qui permet de réordonner les fragments génomiques suite au séquençage. Par la suite, d'autres techniques ont émergé comme le séquençage sur puce, qui permet de reconstituer le génome par hybridation des fragments à des séquences oligonucléotidiques disposées sur la puce.

A partir du début des années 2000, un nouveau type de séquençage est apparu : le séquençage haut débit ou «Next-Generation Sequencing» (NGS). C'est le NGS qui est désormais principalement utilisé, pour sa capacité à séquencer des centaines de milliers de fragments de façon parallèle, à partir de molécules uniques d'ADN. Parmi ces méthodes, on compte le pyroséquençage 454 (Roche 454), le séquençage « ion semiconductor » (Ion Torrent), le séquençage par ligation (SOLiD), le séquençage par synthèse (Illumina). Ces diverses techniques diffèrent par la longueur de la lecture (pb), la précision (dépassant 98%), la lecture totale par expérience, le coût et le temps d'expérience.

C'est actuellement le séquençage par synthèse de la société Illumina qui est le leader mondial, pour le rendement élevé qu'il offre, bien que l'équipement soit coûteux et nécessite des concentrations parfois importantes d'ADN.

V.i.2. Comparaison du NGS et de la PCR digitale en gouttelettes

Ces deux techniques présentent des caractéristiques différentes qui apportent des intérêts complémentaires pour une stratégie de couplage de ces deux outils. Ces caractéristiques sont présentées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 4**).
Paramètres d'analyse	Next Generation Sequencing	PCR digitale en gouttelettes	
Capacité d'analyse	Panel ciblé ou séquençage entier du génome sans connaissance <i>a priori</i> d'altération(s)	une altération jusqu'à un set d'altérations donnée(s) (10 cibles)	
Type de détection	Ratio de séquences altérées en comparaison aux séquences normales	Quantification absolue des séquences cibles	
Sensibilité de détection	<1-5% pour le NGS classique 0,1-0,01% pour le NGS optimisé	<0,01%	
Adaptation à la détection de marqueurs émergents Ex: méthylation	Utilisation de kits prêt à l'emploi	Mise au point de nouveaux tests de détection sans nécessité de modification de l'analyse	
Application à une routine clinique	En cours, intégration dans des plateformes génétiques pour le soin	Pas d'autorisation à procéder à des tests cliniques (utilisation restreinte à la recherche) bien que la simplicité d'utilisation soit adaptée à la pratique clinique	
Coût	Très élevé (système, consommables, stockage de données)	Elevé (système, mise au point des tests de détection, puces, réactifs)	
Etapes et débit d'analyse	Pour 192 échantillons (capacité de 2 puces 96 échantillons / lonProton™): Préparation des librairies (48h) -Etape de run (≥24h) - Chargement des données (≥24h) - Analyses des résultats (24h) Débit: jusqu'à 39 échantillons / jour avec I'IonProton™ (Illumina)	Pour N=8 échantillons: - Préparation du mélange réactionnel (30') - Production de l'émulsion (20') - Thermocyclage (2h30) - Lecture du signal de fluorescence (3h30 RainDance Technologies; Bio-Rad) - Analyse des résultats (30'-1h) Débit: 24 échantillons / jour (RainDrop®) 96 échantillons / jour (ddPCR™) (avec 2 analyses consécutives) Possibilité d'augmenter le débit avec plusieurs appareils de lecture de fluorescence	

Tableau 4. Comparaison des techniques de Next-Generation Sequencing et PCR digitale en gouttelettes. Ces deux technologies sont complémentaires pour une méthodologie d'analyse adaptée à la détection de l'ADN tumoral circulant.

V.ii. Applications à la détection d'ADNtc

Le NGS et la PCR digitale en gouttelettes ont souvent été combinés de façon à effectuer la détection de l'ADNtc chez les patients consécutivement à une analyse par séquençage dans le but d'identifier une altération à suivre dans le plasma. En effet, la détection de l'ADNtc par PCR digitale en gouttelettes a permis d'atteindre une sensibilité allant jusqu'à 1 ADN muté parmi 200 000 ADN non mutés²⁸³. Différentes techniques de NGS ont été optimisées pour la détection de l'ADNtc à une sensibilité inférieure à 1%.

En particulier, la méthode CAPP-Seq, « CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing », a été définie comme une technique visant à limiter les coûts de séquençage par le ciblage de régions fréquemment mutée. Cette méthode a été évaluée pour la détection de maladie résiduelle minime et le suivi, chez des patients atteints de cancer du poumon²⁸⁴.

Les auteurs ont évalué le bruit « biologique » ainsi que le bruit relatif au test, afin de déterminer la sensibilité de l'analyse. Ils ont évalué la limite de sensibilité à 0.01% concernant le bruit « biologique ». Concernant la limite de détection relative au test, divers paramètres ont été évalués (taux de capture, contamination croisée, biais allélique, et erreurs liées au séquençage ou à la PCR) afin de déterminer l'impact de chacun. Notamment, la linéarité et la sensibilité de la méthode ont été

testées (Figure 34A), ainsi que l'impact du nombre de mutations ciblées sur la fraction d'ADNtc mesurées (Figure 34B, C).



Figure 34. Evaluation des performances analytiques du système CAPP-Seq. A) Linéarité et sensibilité de détection du système CAPP-Seq, obtenu par dilutions en série d'ADN muté EGFR dans de l'ADN normal. B) Effet du nombre de mutations observé sur la fraction observée (intervalle de confiance (95%) représentés en gris). C) Analyse de l'effet du nombre de mutations sur le coefficient de correlation moyen entre les fractions attendues et observées (données du panel B). Issu de Newman et al.²⁸⁴.

Les auteurs ont pu détecter l'ADNtc chez 100% des patients atteints de cancer de stades II à IV, et chez 50% des patients en stade I. En outre, une corrélation a été observée entre la quantité d'ADNtc et la masse tumorale. Les fractions d'ADNtc décrites varient de 0.02% à 3.2%, suggérant une sensibilité de détection élevée.

Le NGS a été utilisé pour l'évaluation de la méthylation de promoteurs de gènes impliqués dans le carcinome hépatocellulaire (*h19*, *IGF2*, *VIM*) détectée dans l'ADN circulant plasmatique²⁸⁵. Dans cette étude, les auteurs ont décrit une méthylation plus élevée de ces gènes chez les patients en comparaison aux sujets sains.

Une étude récente a porté sur l'identification d'aberrations chromosomiques dans le plasma de femmes enceintes présentant un lymphome folliculaire. Les auteurs ont observé des similitudes notables entre les profils d'aberrations chromosomiques dans le plasma et dans le lymphome folliculaire²⁸⁶. Des aberrations du nombre de copies de gènes étaient détectées en l'absence de telles aberrations dans les cellules présentes dans le sang de l'échantillon (plasmatique) correspondant. Un tel résultat suggère que les altérations identifiées proviennent de l'ADN dérivé des cellules de lymphome plutôt que des cellules tumorales circulantes.

L'utilisation de « codes-barres » pour marquer les molécules d'ADN cibles a été décrite pour augmenter la sensibilité et la spécificité de l'analyse par séquençage²⁸⁷. Ce système permettrait une quantification absolue de l'ADN muté circulant, en s'affranchissant du taux d'erreur induit lors de la lecture des séquences, et au cours de la préparation de la librairie.

V.iii. Intégration de la PCR digitale en gouttelettes aux analyses par NGS

En vue de l'intégration du typage génétique dans la prise en charge en routine clinique, le séquençage est en pleine expansion. Dans le contexte de la médecine personnalisée, afin de déterminer le statut RAS / RAF de patients avant l'administration d'une thérapie anti-EGFR ou anti-

RAF, le séquençage nouvelle génération est de plus en plus pratiqué en remplacement des analyses Sanger ou qPCR.

Des développements de la PCR digitale en gouttelettes sont dédiés et intégrés à ces analyses concernant divers aspects, présentés ci-dessous : évaluer la qualité de l'échantillon, amplifier les librairies à séquencer et évaluer leur concentration, ainsi que pour la validation des résultats de séquençage.

V.iii.1. Evaluation de la qualité de l'échantillon

L'intégrité et la qualité des échantillons joue un rôle déterminant sur la capacité d'analyse, notamment avant la préparation des librairies de séquençage ainsi que pour l'analyse de banques d'ADN. Il est primordial de pouvoir déterminer la quantité d'ADN amplifiable, d'autant plus si elle est très faible.

Un test multiplex en PCR digitale en gouttelettes a été développé pour quantifier précisément l'ADN de tissus tumoraux, tout en déterminant l'intégrité de l'ADN, via le ciblage de 4 séquences de tailles variables (78 pb, 159pb, 197 pb, 550 pb) et situées sur des gènes différents²⁸⁸. Ce test a été appliqué à l'analyse d'ADN très fragmenté issu de tissus conservés en paraffine (FFPE). Bien que la quantité d'ADN soit généralement élevée dans ce type d'échantillon, la qualité de l'ADN peut être médiocre et peut mener à une analyse de séquençage biaisée¹⁹³.

Avoir recours à ce type de test avant l'analyse NGS permettrait de sélectionner les échantillons ou les blocs FFPE dont l'ADN dans lesquels l'ADN est le plus intègre, d'adapter la quantité d'ADN avant de procéder à l'analyse. Une utilisation à bon escient de tissus précieux serait ainsi favorisée, tout en permettant de produire des résultats plus fiables.

V.iii.2. Analyse quantitative des librairies

Une fois les librairies de séquençage produites, elles doivent être quantifiées afin de charger la quantité d'ADN adéquate à séquencer. Plus la quantification est précise, meilleure est l'analyse qui s'ensuit. Une sous-estimation ou une surestimation de la quantité d'ADN amplifié mènent à une utilisation non optimale du séquençage par la génération de clusters plus ou moins denses. En particulier, une surestimation conduirait à analyse une quantité d'ADN trop faible, ce qui pourrait limiter la sensibilité du test. Il est donc primordial de quantifier précisément les librairies avant de passer à l'étape de séquençage.

Un système a été décrit sur la base de l'utilisation de l'intercalant EvaGreen couplé à la PCR digitale en gouttelettes (Genome Scan/Service XS). D'après une étude comparant des résultats de séquençage par Illumina, ce système a montré une efficacité inférieure en comparaison au Bioanalyzer d'Agilent, utilisé classiquement. Une autre étude a démontré la cohérence de la quantification de librairies par PCR digitale utilisant le système RainDrop®, et les résultats de séquençage (RainDance Technologies[™]).

Une étude récente a comparé les kits de préparation de librairies existants dans le commerce pour la réalisation d'un séquençage NGS Illumina^{TM289}. Pour ce faire, les auteurs ont développé un test en ddPCRTM (Bio-Rad) quantifiant l'ADN à différentes étapes de la préparation de librairies. Les

ADN sont quantifiés avant et après liaison aux adaptateurs, et suite à l'amplification PCR, ce qui permet un traçage précis de l'analyse tout en adaptant la quantité d'ADN requise pour le séquençage.

V.iii.3. Validation des résultats

La PCR digitale en gouttelettes permet par sa sensibilité de valider un résultat de séquençage incertain en raison de la faible quantité d'ADN analysable et du bruit de fond généré.

Dans une étude portant sur le cancer de l'ovaire, cette stratégie a pu être appliquée²⁹⁰. Les auteurs ont réalisé un séquençage (Ion Torrent AmpliSeq[™] Cancer Panel) et validé les résultats par plusieurs autres systèmes (Fluidigm-MiSeq, Sanger et/ou PCR digitale (Raindance Technologies[™])).

Dans ce contexte, la PCR digitale en gouttelettes peut aussi permettre de confirmer la présence de mutations faiblement représentées²⁶⁴, ou encore d'évaluer précisément le pourcentage de mutation obtenu afin d'évaluer ou valider quantitativement les résultats de séquençage. Dans une étude récente, Pécuchet *et al.* ont développé un algorithme d'analyse de résultats de séquençage de l'ADNtc adapté à la détection de mutations rares²⁹¹. Les auteurs ont comparé leurs résultats à ceux obtenus par PCR digitale en gouttelettes pour l'analyse de 231 échantillons d'ADN plasmatique. Une forte corrélation a été observée entre les deux méthodes, suggérant la pertinence de leur stratégie d'analyse.

V.iv. Optimisation du NGS par la PCR digitale en gouttelettes : enrichissement ciblé

La détection de cibles très faiblement représentées réalisée en une seule expérience chez des sousgroupes de patients est désormais possible²⁹². Le NGS est devenu la technologie de référence pour la caractérisation de l'hétérogénéité tumorale, pour l'analyse de l'ADNtc et pour la détection d'altérations de prédisposition héréditaire. L'enrichissement ciblé de loci spécifiques du génome humaine a pu permettre l'analyse par séquençage de modifications génétiques chez de nombreux patients simultanément²⁸⁴.

La PCR digitale en gouttelettes est un outil qui s'avère utile pour une telle application. En particulier, une méthode utilise la production de gouttes par système microfluidique pour l'encapsulation d'une molécule d'ADN génomique dans des gouttelettes contenant des paires d'amorces, générant ainsi 2.5 millions de bioréacteurs²⁹³. 47 gènes et un total de 435 exons ont été ciblés dans chacun des 6 échantillons analysés et plus de 99% des variants génétiques ont été détectés. Une technique basée sur ce système a été commercialisée par la société Raindance Technologies[™] (ThunderStorm®), permettant de cibler jusqu'à 20 000 séquences dans chaque gouttelette. Cette plateforme a été adaptée à divers panels de séquençages pour la détection de prédispositions héréditaires, par exemple dans le cancer du sein²⁹⁴, de mutations somatiques²⁹⁵ ou encore l'étude du niveau de méthylation²⁹⁶.

Un autre système (ThunderBolts®), commercialisé par la même société, est présenté comme une alternative aux étapes de préparation de librairies proposées par Illumina (**Figure 35**). L'ADN génomique issu de tissus ou de biofluide est compartimenté en millions de gouttelettes produites par le système RainDropTM. Les ADN ainsi encapsulés sont amplifiés par réaction de PCR et sont

récupérés, pour être purifiés. Un second thermocyclage est réalisé, en présence de paires d'amorces de panels validés par la société de séquençage (« Cancer panel » par exemple) ou de panels sur mesure.

La production de plusieurs millions de gouttelettes hautement monodisperses garantit l'encapsulation d'un ADN unique par compartiment. Cela permet d'amplifier les séquences avec une efficacité égale, et de s'affranchir de biais dus à la PCR. Une couverture plus uniforme de la séquence est obtenue avec un tel système, offrant ainsi un gain de sensibilité et de spécificité pour l'enrichissement d'ADN issus de biopsies liquides.



Figure 35. Etape de préparation d'une librairie de séquençage par enrichissement ciblé via la PCR digitale en gouttelettes. Par cette technique, la librairie d'ADN amplifiés est purifiée, et la quantité d'ADN à séquencer est contrôlée.

V.v. Couplage du NGS et de la PCR digitale en gouttelettes pour le diagnostic, le suivi, et l'orientation thérapeutique des patients

Dès lors que la concordance entre l'ADN de tissu et l'ADNtc a été explorée, le couplage NGS-dPCR en gouttelettes a été fréquemment utilisé dans le but de caractériser la tumeur primitive ou le tissu métastatique d'un patient pour effectuer consécutivement le suivi en série de l'ADNtc (illustration en **Figure 36**). En couplant l'analyse large spectre du séquençage à l'analyse dPCR, de nombreuses études ont démontré la faisabilité du suivi des altérations dans le plasma de patients^{266,267}. De cette façon, l'étude de l'hétérogénéité intra-tumorale et spatio-temporelle est possible par le recours à une analyse en série d'échantillons de plasma.



Figure 36. Représentation de la stratégie couplant le NGS pour la caractérisation de l'ADN tumoral issu de la biopsie et la PCR digitale en gouttelettes pour l'analyse en série d'échantillons d'ADNtc pour le suivi des patients. Croix rouge : présence d'une mutation ; Me : présence d'un groupement méthyl.

A titre d'exemple, Heinart *et al.* ont mis au point jusqu'à 6 tests personnalisés, suite au séquençage génome entier des ADN de tissus. Ainsi, les auteurs ont démontré la possibilité de détecter précocement une récidive potentielle.

Récemment, Izumchenko *et al.* ont mis en évidence le rôle de mutations impliquées dans la tumorigenèse du cancer du poumon par le couplage du séquençage et de la PCR digitale en gouttelettes. L'analyse par NGS d'ADN issu de tissus d'adénocarcinomes *in situ*, peu avancés et avancés a permis de détecter les mutations *KRAS*, *EGFR* et *TP53*, et de les retrouver dans l'ADN circulant correspondant²⁹⁷. Ce travail démontre la pertinence de cette stratégie de couplage dans la compréhension des mécanismes d'oncogenèse et ouvre la voie à la détection de marqueurs prédictifs.

Dans le cas de tumeurs encore peu caractérisées en raison de la faible occurrence de certains types de cancers, il est nécessaire de mieux décrire les altérations qui pourraient faire l'objet de thérapies ciblées. Le profil mutationnel et les aberrations du nombre de copies de gènes ont été ainsi caractérisés dans le carcinome du péritoine, pour lequel les outils thérapeutiques sont restreints²⁹⁸. Ainsi, il serait utile d'évaluer la pertinence du suivi de certaines altérations identifiées.

Dans certains types de cancer, il est cependant difficile d'identifier une mutation à cibler. Dans le cancer de l'ovaire par exemple, le gène *TP53* est fréquemment muté bien qu'il n'y ait pas de mutations particulièrement représentées. On retrouve de nombreuses mutations rares ou uniques. Pereira *et al.* ont utilisé la PCR digitale en gouttelettes pour le développement de tests consécutivement à l'identification par séquençage de mutations somatiques dans la tumeur des

patientes²⁹⁹. Dans 66% des cas, les mutations identifiées étaient situées sur le gène *TP53*. Au total, 52 tests personnalisés ont pu être développés et caractérisés (sensibilité, spécificité), pour le suivi de l'ADNtc chez 32 patientes. Une telle stratégie est coûteuse et serait difficilement applicable en clinique.

VI. Conclusion

La détection de biomarqueurs reflétant les caractéristiques du cancer est un objectif principal de la médecine personnalisée. Suivre les variations de la maladie au plus proche de son évolution moléculaire permettrait d'optimiser l'orientation thérapeutique et le rapport bénéfice/risque des traitements.

L'émergence des biopsies liquides représente un grand pas dans la recherche sur l'amélioration de la prise en charge thérapeutique. Un premier aspect a pour objectif de visualiser précisément, et globalement, le profil du génome tumoral. En effet, les biopsies liquides sont sources de composants représentant la diversité tumorale, et offrant la possibilité d'explorer les mécanismes de tumorigenèse. Ces composants, identifiés comme des marqueurs circulants potentiels, pourraient être représentatifs de l'évolution du cancer. Un autre aspect, non négligeable dans le contexte de la médecine personnalisée, est l'optimisation des soins, par la possibilité de surveiller à intervalles réguliers la maladie grâce aux prélèvements minimalement invasifs.

Il faudrait préciser l'interprétation des données obtenues grâce aux nouvelles stratégies utilisant des méthodes très sensibles pour détecter l'ADNtc. Les données relatives à l'analyse de l'ADNtc dans le cadre de traitements ciblés démontrent qu'il est parfois possible de détecter de l'ADNtc chez les patients dont la tumeur est négative pour la présence d'une altération, ou bien de ne pas détecter d'ADNtc tandis que l'ADN de tissu tumoral est positif pour la présence d'une altération. De telles observations soulignent la nécessité de préciser les méthodes d'analyse de l'ADNtc et de comprendre leur signification. Il faudrait pouvoir déterminer si une concentration non nulle est suffisante pour considérer que le statut du patient est positif, ou bien s'il faudrait mettre en place des seuils de détection ayant une signification clinique.

Ces aspects génèrent cependant des challenges technologiques et cliniques non négligeables. Il faut, dans un premier temps, pouvoir détecter les marqueurs circulants, qui sont rares dans la circulation sanguine ou autres biofluides. L'ADN tumoral circulant, par exemple, est libéré par la tumeur ou les métastases, et porte des altérations spécifiques du cancer. Il est en revanche hautement dilué dans de l'ADN circulant non altéré libéré par les cellules saines de l'organisme présent dans le fluide biologique analysé. L'enjeu repose sur la mise au point de techniques fiables rendant possible la détection de ces altérations.

Dans ce contexte, la dPCR a émergé comme une technique particulièrement adaptée à la détection de séquences rares d'ADN. Le couplage de la microfluidique de gouttes à la dPCR, a permis d'atteindre des seuils de sensibilité et de précision inégalés, propices à l'étude de fluides complexes. La compartimentation en millions de partitions de volumes miniaturisés est adaptée à la détection de cibles rares à haut débit d'analyse, tout en permettant une économie d'échantillons cliniques précieux.

La détection quantitative de l'ADN tumoral circulant a pu être réalisée grâce au développement de systèmes commerciaux. Des recommandations quant à la manipulation de ces systèmes, et à l'analyse des résultats, permettent de peu à peu de démocratiser leur utilisation de façon routinière en laboratoire de recherche. Ainsi, la PCR digitale représente un outil idéal pour l'évaluation de l'impact clinique de l'ADN tumoral circulant et autres potentiels marqueurs circulants. Cela représente un pas vers la démonstration du potentiel de ce marqueur pour le suivi et l'orientation thérapeutique des patients.

OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

Dans ce projet de thèse, une première partie s'intéressait à l'optimisation de la détection de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) par PCR digitale en gouttelettes. Le développement et la caractérisation de tests couplant des technologies de détection de séquences spécifiques à cet outil hautement sensible visaient à déterminer son potentiel en termes de sensibilité et de spécificité pour la détection de l'ADNtc.

Un autre aspect jouant un rôle déterminant sur la quantification de l'ADNtc est la structure des fragments circulants. Sur cette base, un second objectif a été de caractériser la fragmentation de l'ADNtc afin de spécifiquement le cibler et par là même, maximiser le taux de détection. Le potentiel de l'ADNtc comme marqueur a également été évaluée.

La possibilité de détection d'un marqueur permettant de s'affranchir de la détermination du statut mutationnel a été interrogée. Un tel marqueur permettrait d'élargir le panel de patients qui pourraient être suivis, tout en limitant le nombre de tests à développer. Dans ce contexte, la méthylation de gènes cibles dans l'ADN circulant de patients atteints de cancer colorectal a été analysée. Cette alternative au ciblage de mutation a été évaluée afin d'aller vers un biomarqueur universel de ce cancer.

Une seconde partie de ce projet s'est orientée sur l'étude du potentiel clinique de l'ADNtc pour le suivi des patients.

La détection de marqueurs permettant d'optimiser l'orientation et le bénéfice thérapeutique au cours du suivi des patients atteints de maladie métastatique est un objectif central de notre étude. En efftet, le projet PLAsma COLon a permis d'interroger les paramètres pronostiques et prédictifs de la mesure de l'ADNtc. Préciser les paramètres pertinents de l'analyse de ce marqueur permettrait de définir son potentiel en tant qu'outil clinique.

Enfin, un dernier chapitre est consacré à une autre application clinique visant à explorer la pertinence du suivi de l'ADNtc et du dosage sanguin du vemurafenib (traitement inhibiteur de *BRAF* muté) chez des patients atteints de mélanome métastatique.

PARTIE A : DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES METHODES DE DETECTION DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT PAR PCR DIGITALE EN GOUTTELETTES

PREAMBULE

Dans cette partie du manuscrit, les nouvelles méthodes de détection développées au cours de la thèse seront présentées. Elles visent à optimiser, simplifier et caractériser les tests de détection de l'ADNtc par PCR digitale en gouttelettes. Elles reposent sur la détection d'une altération, dans un premier temps d'une mutation, consécutivement au séquençage ou au test en qPCR de l'ADN de tumeur (**ch. A.I.**).

Dans le cadre du développement de tests et de leur optimisation en PCR digitale en goutelletes, un travail collaboratif a fait l'objet de la caractérisation de plusieurs tests ciblants diverses mutations, dans différentes pathologies. Ce travail a fait l'objet d'un article (**Ch.A.I.2**). Les considérations relatives à la spécificité des tests, à la sensibilité de détection y sont présentées.

Toujours dans le but d'optimiser la détection et la quantification de l'ADNtc, une autre approche a été abordée : l'étude de l'intégrité de l'ADN (ch.A.II.). Un test de validation de la fragmentation de l'ADNtc a été mis au point, et appliqué à des échantillons cliniques. Cela a permis d'évaluer le potentiel de l'intégrité comme marqueur du cancer (sous-ch.A.II.1). Un travail annexe a été dédié au développement d'un modèle d'induction de la mort cellulaire dans des lignées afin d'en étudier l'impact sur la fragmentation de l'ADN (sous-ch. A.II.2). Enfin, dans ce chapitre, une nouvelle approche a été utiliséée basée sur un système d'électrophorèse capillaire non encore commercialisé (BIABooster, Picometrics) pour la détermination du profil de distribution en taille de l'ADNtc (sous-ch.A.II.3), dans le cadre d'une collaboration avec la société Picometrics.

Dans le chapitre **A.III.**, nous présentons l'étude de la méthylation de l'ADNtc. Cette approche vise à développer des tests précis et sensibles tout en limitant le nombre de cibles, et donc le nombre de tests à réaliser. Ainsi, la possibilité de détecter l'ADNtc chez un nombre maximum de patients atteints de cancer colorectal serait envisageable. Cette étude joue un rôle clef dans l'application au suivi clinique des patients, comme nous le verrons dans la partie B.

PLAN DE LA PARTIE A

- Chapitre A.I.: Dévelopement de nouvelles méthodes de détection de l'ADNtc par PCR digitale en gouttelettes.
 - Sous-chapitre **A.I.1.**: Développement de tests pour la détection de mutations dans le cancer colorectal par PCR digitale en gouttelettes suite à une analyse NGS.
 - SOUS-CHAPITRE **A.I.2.** : Article: "Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations".
- Chapitre A.II. : Etude de l'intégrité de l'ADN tumoral circulant
 - Sous-chapitre **A.II.1**. : Article en préparation: "Characterization of plasma cell free DNA integrity using picoliter-droplet digital PCR: towards the development of a circulating tumor DNA dedicated assay."
 - Sous-chapitre **A.II.2.**: *Etude du lien entre le processus de mort cellulaire et la fragmentation de l'ADN circulant.*
 - Sous-chapitre **A.II.3**. : Autre approche de l'évaluation du profil de distribution en taille de l'ADNtc : utilisation d'un système miniaturisé de séparation de l'ADN « BIABooster ».
- Chapitre A.III. : Vers un biomarqueur universel du cancer : étude de la méthylation dans le cancer colorectal.
 - Sous-chapitre **A.III.1.** : *Introduction et résumé de l'article*.
 - Sous-chapitre **A.III.2.** : Article: "A Study of Hypermethylated Circulating Tumor DNA as a Universal Colorectal Cancer Biomarker"

CHAPITRE A.I. DEVELOPPEMENT DE TESTS DE DETECTION DE L'ADNTC PAR PCR DIGITALE EN GOUTTELETTES

A.I.1. DEVELOPPEMENT DE TESTS POUR LA DETECTION DE MUTATIONS DANS LE CANCER COLORECTAL PAR PCR DIGITALE EN GOUTTELETTES SUITE A UNE ANALYSE **NGS**.

I. Introduction

Le cancer colorectal fait partie des causes de mortalités les plus fréquentes avec environ 700 000 décès par an dans le monde et une incidence d'environ 1.36 millions de cas dans le monde^{300,301}. Il est d'incidence plus élevée chez les hommes. Lorsque le cancer n'est pas étendu aux ganglions lymphatiques et/ou à des organes distants du site primaire, par la présence de métastases, une résection chirurgicale permet d'atteindre un taux de survie de plus de 80% à 5 ans³⁰⁰. Dans le cas d'un cancer métastatiques ou de récidive post-chirurgie, la survie chute significativement. Des progrès ont été réalisés notamment par les traitements combinatoires de chimiothérapies ainsi et surtout par le recours aux traitements ciblés via l'utilisation d'anticorps (anti-angiogéniques (anti-VEGF), anti-EGFR)³⁰². Cependant, la survie à 5 ans des patients atteints de cancer métastatique reste plafonnée à 11%³⁰³, estimée entre 24 et 34 mois³⁰⁴. Une étude clinique de phase 3 a porté sur l'essai du regorafenib, un inhibiteur de plusieurs kinases, dans le but de traiter en dernier recours des patients ayant progressé (toutes thérapies approuvées déjà testées)^{305,306}. Ainsi la nécessité de développer des agents thérapeutiques ciblant les altérations génétiques « drivers » s'impose pour une amélioration du bénéfice. La connaissance des altérations jouant un rôle clef dans la carcinogenèse est donc primordiale pour l'identification de cibles, en plus du besoin de biomarqueurs permettant d'évaluer l'efficacité thérapeutique et le pronostique.

Dans le contexte clinique actuel, la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancer colorectal inclut de façon récurrente un test mutationnel pour les gènes *KRAS*, *BRAF* ou *NRAS* depuis la mise en évidence de leur rôle dans la résistance aux thérapies anti-EGFR^{148,307}. Dans le cadre de la médecine personnalisée, une généralisation des techniques dites de « criblage » d'altérations génétiques se produit et celles-ci deviennent de plus en plus utilisées en clinique. Le séquençage NGS de l'ADN permet de tester la présence d'un ensemble de mutations plus ou moins large selon le panel utilisé (ensemble des gènes ciblés par des amorces spécifiques de séquences d'intérêt). Ainsi, la détection des mutations de gènes suppresseurs de tumeur ou de proto-oncogènes devient possible par l'utilisation de panels « clef en main » développés sur la base des altérations génétiques les plus impliquées dans le cancer. Parmi celles-ci, on compte *TP53*, *NRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *PTEN*, *TGFβR1/2*, *CTNNB1*. Ces analyses sont possibles à partir d'un échantillon d'ADN extrait d'une quantité restreinte de tissu tumoral. Le NGS, technique la plus adaptée, a été utilisé avec le choix d'un panel dédié à la détection de mutations impliquées dans le cancer Research panel).

L'étude centrale à ce projet de thèse, PLACOL (PLAsma COLon), a fait l'objet du développement de tests en PCR digitale en gouttelettes. En effet, pour les patients ne présentant pas de mutation testée dans le cadre de la prise en charge thérapeutique, il fallait pouvoir identifier une altération spécifique de la tumeur. Au départ du projet, des tests étaient disponibles pour cibler les 7

mutations les plus fréquentes de *KRAS*, et la mutation *BRAF* p.V600E³⁰⁸. Un objectif de ce projet était ainsi de développer des tests pour le suivi de l'ADNtc chez les patients non mutés pour l'une de ces mutations.

Dans un premier temps, l'ADN extrait de tissu de tumeur était testé en NGS afin d'identifier une mutation. Des tests ciblant la mutation identifiée ont été évalués en qPCR. La société Life Technologies valide les tests en qPCR, mais ne garantit pas leur fonctionnement en PCR digitale en gouttelettes.Il fallait donc les évaluer, caractériser leur sensibilité et leur spécificité, et éventuellement ajuster les conditions de réaction en PCR digitale en gouttelettes.

Pour les matériels et méthodes, se référer à l'article inséré en chapitre A.II.

II. Résultats

II.i. Criblage par qPCR des mutations impliquées dans la réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR

Chez 53% des patients, une mutation *KRAS*, *NRAS* ou *BRAF* a été détectée par le test en qPCR. La distribution des mutations détectées chez les patients de la cohorte d'étude est présentée en **Figure 37**. On observe une large proportion de mutations *KRAS* p.G12D, puis p.G12V et p.G13D. Pour ces patients, le suivi de l'ADNtc circulant était donc possible et a permis de quantifier l'ADNtc au long du suivi.



Figure 37. Test du profil mutationnel des tissus tumoraux (biopsie ou pièce opératoire) par sondes TaqMan® ciblant les 7 mutations les plus fréquentes du gène KRAS et la mutation BRAF p.V600E. Chez 61 patients (53%), une mutation fréquente des gènes KRAS, BRAF ou NRAS a été identifiée dans la tumeur. On trouve N=61 mutés, N=54 non mutés. La proportion de mutations p.G12D, p.G12V et p.G13D (respectivement c.35G>A, c.35G>T, c.38G>A) est cohérente avec les données de la littérature (base de donnée Cosmic).

En **Figure 38** sont représentés des graphiques de suivi de l'ADNtc en fonction du temps, avec les données cliniques du patient.



Figure 38. Illustrations de suivis des variations de l'ADNtc (%, courbe bleue) et représentation des données cliniques associées au patient (P). La taille des lésions et le marqueur sérique spécifique du cancer colorectal (antigène carcino-embryonnaire) sont représentés par des barres grises et une courbe rouge, respectivement. Le suivi des variations de l'ADNtc en pourcentage semble être corrélé aux variations de la somme des lésions cibles (barres noires). L'ACE (exprimée en xNormale) est parfois peu ou pas informatif (P45 et P3), montrant ici l'intérêt de l'ADNtc comme marqueur moléculaire.

En revanche pour 47% des patients, aucune mutation n'a été identifiée et le suivi de l'ADNtc nécessitait l'utilisation d'une technique de séquençage (NGS, Ion Proton[™]) pour caractériser le profil mutationnel.

II.ii. Analyse par NGS des ADN extraits de tissus

Brièvement, l'ADN tumoral (10ng) a été utilisé pour ces analyses du statut mutationnel par NGS. L'ADN était amplifié par PCR avec la librairie d'amorces permettant de cibler les séquences comportant les mutations ciblées dans le panel (Ion AmpliSeq[™] Cancer Hotspot Panel v2 and the Ion AmpliSeq[™] Master Mix v2.0 (Ion Torrent[™], Thermo Fischer Scientific). La concentration et la taille des séquences amplifiées étaient ensuite déterminées par un kit Experion[™] (Bio-Rad Laboratories Inc.). Les échantillons étaient identifiés par un code barre via le kit Ion Xpress Barcode Adapters (kit Ion Torrent[™], Thermo Fischer Scientific) puis amplifiés par PCR. Le séquençage était réalisé sur un séquenceur IonProton[™] (Thermo Fischer Scientific). Les résultats de séquençage ont été récupérés sur le site du serveur (Thermo Fischer Scientific) et importés dans un nouveau fichier.

Les variants identifiés ont été ordonnés par position chromosomique et références des gènes et importés dans le logiciel Oncotator (Broad Institute), outil d'annotation de variants tels que les mutations ponctuelles et insertions/délétions. Ce logiciel permet de comparer les résultats obtenus grâce au logiciel d'aide à l'interprétation des variants (Alamut© Interactive Biosoftware). Les détails de chaque variant peuvent ainsi être récupérés (gène, transcrit, conséquence fonctionnelle, contenu en

GC, protéines). Les résultats de l'analyse NGS après sélection des mutations sont présentés en **Figure 39**. Sur la base de la fréquence allélique et de la qualité de lecture, une mutation pouvait être identifiée comme telle chez chaque patient. Les mutations des gènes *TP53*, *KRAS*, *NRAS* étaient les plus représentées.

Parfois plusieurs variants étaient identifiés chez un même patient. Pour le développement de nouveaux tests, nous avons sélectionné dans un premier temps les mutations rares des gènes *KRAS*, puis *BRAF*, *NRAS*, *TP53*, lorsque celles-ci avaient identifiées. Si aucune de ces mutations n'était détectée, les mutations des gènes *SMAD4*, *CTNNB1*, *FBWX7* était sélectionnées. La répartition des mutations identifiées pas NGS est représentée en **Figure 39**.

On observe une grande variété de mutations, notamment dans la séquence du gène *TP53*. Seulement une faible proportion de patients (parfois 1 seul patient) est porteuse de la même mutation. De la même façon, dans le cas des gènes *CTNNB1* ou encore *SMAD4*, il aurait été nécessaire de développer des tests personnalisés à chaque patient. Dans ce contexte, un « pipeline » s'est construit sur la base du criblage large spectre par NGS suivi du développement de tests en PCR digitale en gouttelettes.



Figure 39. Distribution des mutations au sein de la cohorte d'étude, complétion du panel de mutations par les résultats de séquençage. Lorsqu'aucune mutation n'avait été détectée à l'issue de ce test (47% des patients), le séquençage (IonProton[™], panels : Hotspot Cancer Panel V2 ou Ion Torrent[™], Ampliseq Colon Lung Cancer panel V2) a été utilisé pour l'identification d'une altération génétique pour le suivi de l'ADNtc dans le plasma des patients.

II.iii. Développement de tests en technologie CAST[™] (Competitive Allele-Specific TaqMan®)

Les tests commercialement disponibles ont été recherchés et testés en PCR en temps réel puis PCR digitale en gouttelettes sur de l'ADN extrait de tumeurs (biopsie ou pièce opératoire précédemment utilisée pour effectuer le séquençage). Les sondes et amorces ciblant les mutations les plus fréquentes du gène *KRAS* ou de *BRAF* avaient été développées au laboratoire UMRS1147 en

utilisant la technologie TaqMan®. De tels tests ne sont plus commercialisés par l'entreprise Thermo Fischer Scientific, qui fournit des tests CAST[™], basés aussi sur la technologie TaqMan® mais présentant une spécificité supplémentaire (**Figure 40**), description des tests de détection basés sur la fluorescence) : un bloqueur empêche l'amplification de la séquence non mutée (« wild-type ») visant ainsi à offrir une meilleure sensibilité de détection.

A. Système TaqMan®



B. Système CASTTH

Hybridation de l'amorce spécifique de la séquence mutée → action de la polymerase → Élongation puis hydrolyse de la sonde et émission consécutive de fluorescence par le fluorophore



Bioqueur -> action de la polymerase inhibée: I n'y a pas d'élongation



Figure 40. Principe de fonctionnement des sondes de détection TaqMar® et CASTTM. Les sondes TaqMan® sont spécifiques de la séquences tandis que dans le système CASTTM les amorces sont spécifiques de la séquence, et un bloqueur inhibe l'élongation de la séquence non mutée.

Parmi les 16 mutations à tester (**Tableau 5**) identifiées dans une première série de séquençage, 10 tests CAST commerciaux étaient disponibles. Les sondes ciblant les mutations référencées dans le **Tableau 6** (**Annexe A.I.**) ont été testées et validées par le fournisseur pour une application par qPCR. Il fallait ainsi optimiser les conditions en PCR digitale en gouttelettes, et valider leur spécificité et sensibilité.

Pour cela il fallait dans un premier temps ajouter une référence interne, ciblant la séquence non mutée. Celle-ci permet de contrôler la réussite du test (détection de la séquence normale lorsqu'aucun ADN muté n'est détecté) ainsi que la spécificité du test (détection de la cible d'intérêt) (**Figure 41**). Des contrôles positifs (ADN de tumeur séquencé) ont été testés. On observe que certaines tumeurs comportent une forte concentration d'ADN portant la mutation détectée par NGS, d'où l'intensité des populations (nuages de points) observés (**Figure 40** et **Annexes A.II., A.III.**).



Figure 41. Test des sondes CAST[™] ciblant la référence non mutée (ADNg, contrôle négatif) et l'ADN portant la mutation KRAS p.Q61K (dilutions sur ADN de tumeur).

Une dilution de 1/1 à 1/1000 de l'ADN cible dans de l'ADN génomique (non muté) a permis de vérifier la sensibilité de détection de l'ADN muté, de façon adéquate à la détection de clones rares au sein de la tumeur. Les résultats de dilution sont présentés en **Annexes A.II et A.III.**

Les mêmes tests ont été reproduits pour les 10 sondes évaluées. Deux des tests n'étaient pas fonctionnels (en rouge dans le **Tableau 6, Annexe A.I.**) car non spécifiques : une population mutante détectée dans un contrôle négatif (ADN génomique) ou aucune population mutante détectée.

Référence patient	Mutation: gène / modification de protéine codée / changement de nucléotide	Sondes CAST (LifeTechnologies)
P6	TP53 p.R248Q c.743G>A / NRAS p.Q61R c.182A>G	Disponible
P9	NRAS p.Q61R c.182A>G	Disponible
P17	Pas de mutation	-
P16	TP53 p.R273C c.817C>T	Disponible
P23	TP53 p.R175H c.524G>A	Disponible
P24	BRAF p.G469A c.1406G>C	Disponible
P33	KRAS p.Q61H c.183A>C	Disponible
P35	KRAS p.Q61K c.181C>A	Disponible
P41	TP53 p.S241fs c.722Del C c.723DelC	Indisponible
P42	CNTBB1 p.S45F c.134C>T	Indisponible
P43	KRAS A146P c.436G>C	Disponible
P44	SMAD4 G365D c.1094G>A	Indisponible
P48	KRAS Q61K c.TC180_181AA	Disponible
P50	TP53 p.C135Y c.404G>A	Indisponible
P51	Pas de mutation	-
P52	KRAS p.A146T c.G436A	Disponible

Tableau 5. Exemple de résultat de séquençage de tumeur de patients (référence colonne de gauche) et disponibilité de tests CAST[™], en vue du développement de tests en PCR digitale en gouttelettes.

Suite au développement de ces tests en PCR digitale en gouttelettes, la détection de l'ADNtc chez les patients a pu être réalisée, un profil d'ADNtc est présenté ci-dessous (**Figure 42**).



Figure 42. Suivi des variations d'ADNtc chez 2 patients dont la tumeur présente une mutation TP53 détectée par des sondes CASTTM. Sont présentées les variations d'ADNtc (pourcentage, courbe bleue), la mutation détectée est celle du gène TP53 p.R175H (P99) et p.R248Q (P6). Les valeurs des marqueurs cliniques sont représentées : le dosage en antigène carcinoembryonaire (ACE, courbe rouge) et la taille des lésions cibles (barres).

Malgré la faisabilité du suivi, on peut noter un bruit de fond conséquent généré dans certains tests CAST[™] (**Annexes A**). Afin de déterminer quel type de sonde il serait plus pertinent d'utiliser dans la suite des travaux de thèse, une comparaison des limites de blanc obtenues par les tests en technologies CAST[™] et TaqMan® a été réalisée.

II.iv. Comparaison des limites de blanc (LOB) en tests de technologies CAST[™] et TaqMan®.

Les tests développés dans le cadre de l'étude PLACOL, ciblant les mutations *TP53* p.R248Q et *TP53* p.R175H ont été évalués. Pour ce faire, des quantités croissantes d'ADN génomique (ie. ne portant pas la mutation cible) ont été injectées dans le mélange de PCR digitale en gouttelettes, avec les sondes TP53 ciblant les mutations indiquées ci-dessus. Ainsi la quantité de faux positifs (ie. gouttes identifiées par la fluorescence correspondant à la sonde ciblant la mutation) pouvait être déterminée pour chacun des tests CAST[™] et TaqMan®. Une partie des résultats obtenus figurent en annexe (sous forme de graphiques de PCR digitale). Ci-dessous sont représentés les graphiques représentant le nombre de faux positifs obtenus selon la quantité d'ADN génomique déterminée par le nombre de gouttes « non mutée » (**Figure 43**).



Figure 43. Graphiques représentant le nombre de faux positifs obtenus selon la quantité d'ADN génomique testée pour les sondes CAST™ ou TaqMan®. Les sondes CAST[™] (A) et TaqMan® (B) ciblent les *mutations TP53 p.R248Q, p.R175H, p.R273H, KRAS p.G12S.*

Il n'y a pas corrélation entre la quantité d'ADN génomique et le nombre de faux positifs dans les deux cas comme l'indiquent les valeurs de r² (Pearson). Cependant, des quantités élevées de faux positifs sont observées avec les sondes CAST[™], en comparaison aux sondes TaqMan®. En effet, dans le cas des sondes CAST[™], nous observons ce que l'on appelle le « bruit », autrement dit les gouttes détectées entre les population ne contenant pas de cible (« vide ») et la population correspondant aux gouttes contenant des cibles d'ADN mutées (MT). En effet, la quantité de ces gouttes générant du bruit de fond dans l'expérience est très élevée comme cela est visible sur les graphes de PCR digitale (**Figure 44** et **Annexes A.II., A.III.**), populations identifiées dans des rectangles). En revanche, malgré de fortes quantités d'ADN, ces populations ne sont pas obtenus avec les tests TaqMan® (**Figure 44**).



Figure 44. Comparaison des sondes TaqMan® (A) et CAST™ (B) ciblant la mutation TP53 p.R175H. La population mutante est identifiée sur l'axe X, (fluorescence FAM) et la référence TP53 est sur l'axe Y (wild-type (WT), fluorescence VIC). Panel B : une population intermédiaire (« bruit ») est observée entre les populations vides (« quenched ») et mutées (MT). Les populations (cercles ou « clusters ») ont été définies à partir du contrôle positif correspondant.

La **Figure 45** représente la quantité de gouttes dites intermédiaires (faux positifs non situés dans la population « mutée »).



Figure 45. Graphique représentant la quantité de gouttes "faux positifs" (cercles verts, axe Y gauche) et de "bruit" (triangles rouges, axe Y droit) observées dans le cas des sondes CASTTM.

On observe aucune corrélation entre la quantité d'ADN génomique et le bruit observé (r²=0.10, Pearson). En revanche, la valeur du r² a augmenté en comparaison au nombre de faux positifs stricts (compris dans la population mutée « MT » correspondant aux mutants du contrôle positif). Ces données démontrent que les tests développés à l'aide de sondes CAST peuvent être utilisés, à certaines conditions. Dès lors qu'une forte quantité d'ADN est testée, les conditions d'expérimentation risquent d'influencer la qualité de l'analyse. Ainsi, le nombre de faux positifs observé dans le cas de certaines sondes CAST[™] (en l'occurrence dans la **Figure 44**) ne saurait être acceptable pour l'analyse d'échantillons.

III. Conclusions

L'outil de PCR digitale en gouttelettes s'avère particulièrement pertinent pour la détection de cibles rares telles que l'ADN muté hautement dilué dans de l'ADN non muté. L'objectif du travail d'établissement d'un couplage NGS-PCR digitale était de développer des tests sensibles adaptés à la détection de mutations rares, en collaboration étroite avec les cliniciens travaillant sur l'étude clinique en cours afin de suivre l'ADNtc de tous les patients. Les sondes TaqMan® ciblant les mutations *KRAS* (exon 2, codons 12 and 13) utilisées au laboratoire, ont été couplées à la technique de PCR digitale en gouttelettes ²⁸³. Des travaux portant sur la détection de clones rares *KRAS* dilués au sein d'échantillons tumoraux via cet outil ont été publiés ¹⁴³. Les sondes CAST[™] ciblant les sept mutations les plus fréquentes du gène *KRAS* ont été utilisées au laboratoire hôte dans le processus de validation des mutations identifiées (dans la tumeur) dans les ADN extraits de plasma. En PCR quantitative en temps réel, ces sondes se sont démontrées fonctionnelles.

Afin de déterminer quel test (CAST TM ou TaqMan®) était le plus approprié à la détection de l'ADNtc extrait de plasma, un travail a été mis en place au sein du laboratoire, qui a fait l'objet d'une publication portant sur les tests ciblant le gène *EGFR* dans le cadre d'une étude sur le cancer du poumon non à petites cellules, présenté en **A.I.2**.

Ce travail de développement de tests en PCR digitale en gouttelettes a joué un rôle déterminant dans le choix des outils de détection moléculaires de mutations pour le suivi de l'ADNtc.

En effet, le bruit (limite de blanc, nombre de faux positifs) devrait être évalué de manière récurrente lors du développement de tests au sein de laboratoire, afin de fixer un seuil de tolérance et de caractériser le test. Un tel seuil peut être variable selon le type d'application du test.

Pour le ciblage de l'ADN extrait de tumeur, souvent très concentré, l'objectif peut être de valider la présence de la mutation qui a été identifiée au préalable par NGS. Dans ce cas, les sondes CAST[™] telles que l'on a pu les caractériser sont utilisables dès lors que la population ciblée (« cluster de gouttes ») n'est pas trop proche du « bruit ». Comme observé plus haut, l'amplification PCR peut aboutir à des populations normales (non mutées, WT) et mutées (MT) relativement proche des gouttes vides de séquence cible. Dans ce cas, il peut s'avérer avec ce système de détection difficile de différencier la population de mutants de celle des vides, ce qui aboutirait au calcul de pourcentage de mutation approximatif.

Pour une quantification précise de l'ADN cible dans des échantillons qui peuvent s'avérer complexes, tels que les ADN extraits de plasmas, il est difficile, pour certains tests, de valider leur utilisation. Suite à ces travaux, des tests sensibles ont été développés, et ont démontré des limites de détection très bonnes (1 goutte mutée parmi un nombre d'ADN cibles normaux (non mutés) de 200 000²¹⁰, ainsi que des spécificités (limite de blanc proche de 0). En conséquence, chaque test devrait être évalué dans différentes conditions faisant varier le type d'échantillon (ADN plasmatique, ADN de tissu de biopsie), la quantité d'ADN (ADN muté ou ADN génomique normal) pour déterminer les limites de l'analyse.

Dans le cadre de l'émergence de publications portant sur la détection de cibles rares (ADNtc, ADN fœtal), un besoin de confronter les techniques de détection utilisées par les chercheurs a émergé. Ainsi, de la même façon que des règles de bon usage de PCR quantitative en temps réel ont été mises en place dans le but d'harmoniser les pratiques des chercheurs et la solidité des données publiées²⁵⁸, des recommandations ont été publiées pour la PCR digitale³⁰⁹. La publication portant sur la comparaison de différents systèmes de détection utilisant des sondes fluorescentes (Zonta E. *et al*²⁴⁶) inclut l'analyse d'échantillons cliniques, démontrant le potentiel de la PCR digitale comme outil de détection d'ADNtc. Cet article a donc été réalisé dans le but de respecter ces recommandations et ainsi participer au transfert de la technologie de PCR digitale en gouttelettes vers une utilisation dédiée aux applications cliniques.

A.I.2. RESUME DE L'ARTICLE PORTANT SUR LA DETECTION MULTIPLEX DE MUTATIONS RARES PAR **PCR** DIGITALE EN GOUTTELETTES

Introduction

Le développement de la PCR digitale et du NGS ouvre la voie au suivi régulier de la réponse au traitement et à l'apparition de résistance potentielle par les biopsies liquides et notamment par l'ADNtc. Pour ce faire, des tests précis et qualitatifs de détection de l'ADNtc doivent être développés.

Dans ce contexte, ce travail visait à évaluer l'efficacité de tests de détection commercialisés, basés sur des technologies différentes (CAST[™], TaqMan®, ZEN). Ces tests ont été adaptés en PCR digitale en gouttelettes pour comparer leur sensibilité et leur spécificité, et pour évaluer leur applicabilité à l'analyse d'échantillons cliniques.

Matériels et méthodes

La sensibilité des sondes ciblant les mutations KRAS (p.G12D, p.G12S), TP53 (p.R273H, p.R213*) et EGFR (p.L858R) a été évaluée par la détermination du pourcentage de mutation observé sur des ADN de lignées cellulaires portant l'altération d'intérêt. Des dilutions d'ADN muté dans de l'ADN non muté (ratios de 1/10 à 1/10 000) ont permis de comparer les sensibilités et linéarités des sondes ciblant la même altération.

La spécificité de chacune des sondes développées en technologie CAST[™] et TaqMan® a été évaluée par la détermination du nombre de faux positifs observés (limite de blanc, LOB).

La faisabilité de cibler plusieurs altérations génétiques en un test (multiplexage) a été évaluée par le développement et l'optimisation d'un multiplex détectant plusieurs mutations du gène *EGFR* dont ii) les mutations de sensibilité p.L858R, p.L861Q, et la délétion DEL19, ii) la mutation de résistance p.T790M.

Principaux résultats

A. Aspect quantitatif

Selon le type de sonde (TaqMan® ou CAST) utilisé, le pourcentage de mutation observé est légèrement différent (pour les mutations des gènes *TP53* et *KRAS*) mais reste proche, ce qui s'explique par la différence entre les technologies, l'une détectant les WT et MT sur la même séquence (TaqMan®), l'autre considérant une référence WT située sur une séquence différente de la séquence MT ciblée (voir article).

- Comparaison des sondes CASTTM et TaqMan®

Pour la detection des sondes KRAS p.G12S et TP53 p.R273H, le test TaqMan® a démontré une meilleure efficacité de détection. Au contraitre, pour la détection de la mutation EGFR p.L858R, le test CAST[™] était plus efficace en terme qualitatif (meilleure concordance entre le nombre de génomes théorique et le nombre de génomes mesuré).

Comparaison des sondes CAST[™] et ZEN

Pour la mutation EGFR p.T790M, le test reposant sur la technologie ZEN a démontré une meilleure sensibilité.

B. Tests de la spécificité : calcul de la limite de blanc (LOB)

Pour les sondes CAST[™] ciblant les mutations EGFR p.T790M, TP53 p.R273H and p.R213* le nombre de faux positifs était plus élevé que pour les sondes TaqMan® correspondantes lorsque qu'une forte quantité d'ADN génomique normal était utilisé, ce qui n'était pas le cas du test ZEN pour la mutation EGFR p.T790M.

Pour les autres tests dont le nombre de faux positifs était indépendant de la quantité d'ADN génomique, la limite de blanc était calculée et ne variait pas selon la quantité d'ADN. Les LOB observées variaient de 0 à 8. Les valeurs les plus élevées de LOB (>4) correspondaient à la sonde ZEN ciblant la mutation p.T790M (LOB=7) et à la sonde CAST[™] ciblant la mutation KRAS p.G12S (LOB=8).

C. Tests de la linéarité et de la sensibilité des tests de détection: dilutions en série de l'ADN muté dans de l'ADN génomique (non muté)

La sensibilité, d'après les courbes de dilution obtenues pour les sondes ciblant les séquences des gènes *KRAS*, *EGFR* et *TP53* en CAST[™] ou TaqMan®, démontre qu'il est possible de détecter jusque quelques mutants au sein de plus de 10 000 génomes normaux (i.e. non mutés) soit une limite de détection de 0.01%. En revanche pour les tests CAST[™] EGFR p.T790M, TP53 p.R273H et TP53 p.R213*, la sensibilité était limitée à 0.1% de détection de l'ADN muté.

D. Application à des échantillons cliniques : comparaison des résultats obtenus par PCR digitale en gouttelettes aux analyses par NGS et par qPCR

Analyse en NGS. Les tests CAST[™] L858R, L861Q, Del19 et ZEN[™] p.T790M ont permis le ciblage des mutations *EGFR* identifiées au préalable sur tissu par séquençage chez 8 patients. Les pourcentages observés sont cohérents entre les deux méthodes, bien que la PCR digitale indique souvent des pourcentages plus élevés et dans 2 cas sur 6, le pourcentage était nul en NGS, et supérieur à 1% en PCR digitale en gouttelettes.

Analyse en qPCR. Parmis 8 échantillons analysés en qPCR, 4 échantillons avaient été identifiés comme négatif pour la présence d'une mutation tandis qu'ils étaient positifs par l'analyse en PCR digitale en gouttelettes.

E. Développement d'un test multiplex

La spécificité et la sensibilité des tests 3-plex et 4-plex ciblant les mutations du gène EGFR p.L861Q / p.L858R / Del19 et p.T790M en technologies CAST[™], TaqMan® et ZEN, ainsi qu'une référence (non mutée, WT) ont été évaluées.

La LOB et la LOD ont été calculées conformément à la statistique de Poisson sur des ADN fragmentés de lignées cellulaires.

On observe que les LOB ne varient pas selon la quantité d'ADN génomique analysée (30 ng ou 60 ng). Cependant, la LOB du test ciblant la délétion DEL19 est assez élevée en 3-plex (9) et en 4-plex (21) tandis que les LOB des autres cibles sont toutes inférieures ou égales à 6 (*p.L858R* : 3-plex, LOB=6 ; 4-plex, LOB=3 ; *p.L.861Q* : 3-plex, LOB=0 ; non testée en 4-plex ; *p.T790M* : 3-plex, LOB=4 ou 0 ou 3 (cible testé dans trois 3-plex), 4-plex : 3).

La LOD étant dépendante de la LOB (Milbury *et al.*²⁵⁹), les LOD de tests dont la LOB est plus grande sont en conséquence plus élevées. Ainsi en 3-plex et en 4-plex, on observe les LOD suivantes pour les tests de détection des altérations: *DEL19* : 15 et 30 ; *p.L858R :* 11 et 7 ; *p.L861Q* : 3 (non testé en 4-plex), respectivement.

Des mélanges d'ADN provenant de tissus FFPE et portant différentes altérations, en proportions connues, ont été fournis par la société Horizon Diagnostics afin de les analyser avec les tests multiplex mis au point. Une concordance a été observée entre les pourcentages de mutation retrouvés par l'analyse de ces ADN et les pourcentages attendus, démontrant l'efficacité des tests multiplex.

Conclusion

Certains tests commerciaux peuvent s'avérer utiles selon l'application qui leur est destinée et l'altération génétique ciblée. Ainsi, le développement de tests en duplex et en multiplex avec les sondes de technologie adaptée est nécessaire pour atteindre une efficacité optimale.

Le test développé en technologie ZEN qui cible la mutation EGFR p.T790M présente une LOB de 7 en duplex. Milbury *et al.* ont pu observer une LOB de 50,1 pour le test p.T790M avec une sondes de détection basée sur la technologie TaqMan®²⁵⁹. Pour la mutation EGFR p.L858R, les auteurs décrivent en revanche une LOB de 1.3 et une LOD de 5, ce qui est concordant avec nos résultats (LOB : 0 ; LOD : 3 en TaqMan® ; LOB : 4 ; LOD : 9 en CAST[™]). Ces données suggèrent que la technologie de détection choisie peut permettre une optimisation importante. Cependant, il persiste du « bruit » dans les analyses de détection de la mutation EGFR p.T790M qui semble dû à la région du gène ciblée (présence de SNP, séquences répétées proches de la zone ciblée, ou de pourcentage en di-nucléotides GC).

Les résultats attestent de la possibilité de développer un large panel de tests à application clinique qui s'avèrent particulièrement pertinent dans le cadre du suivi de patients pouvant bénéficier de thérapies ciblées en complément des techniques de séquençage. Un test multiplex permettant d'attester simultanément la sensibilité et la présence potentielle d'une résistance au traitement anti-EGFR serait particulièrement d'intérêt dans le contexte actuel. En effet, une AMM a été délivrée pour laisser la possibilité aux oncologues de tester la présence d'une mutation de sensibilité au traitement ciblé anti-EGFR, avant le choix de l'orientation thérapeutique¹¹.

Les analyses du génome tumoral par NGS mènent parfois à l'identification de plusieurs altérations. Il peut être difficile de choisir l'altération qui serait la plus pertinente à cibler pour le suivi des patients, ce qui pourrait rendre pertinente l'utilisation d'un test multiplex ciblant un ensemble de mutations.

Dans certains types de cancer, il n'est cependant pas toujours évident de détecter des mutations récurrentes, au contraire des mutations ciblées dans le cancer du poumon ou le cancer colorectal. A titre d'exemple, il pourrait être compliqué de déterminer quelles mutations du gène *TP53* il serait utile de cibler dans le cancer de l'ovaire ou du sein, étant donné qu'il existe un très grand nombre de mutations de ce gène et que ces mutations sont rares.

A.I.3. ARTICLE

"Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations"



G OPEN ACCESS

Citation: Zonta E, Garlan F, Pécuchet N, Perez-Toralla K, Caen O, Milbury C, et al. (2016) Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations. PLoS ONE 11(7): e0159094. doi:10.1371/journal.pone.0159094

Editor: Javier S Castresana, University of Navarra, SPAIN

Received: April 4, 2016

Accepted: June 27, 2016

Published: July 14, 2016

Copyright: © 2016 Zonta et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Université Paris-Descartes, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Institut National du Cancer (INCA, no. 2009-1-RT-03-US-1 and 2009-RT-03-UP5-1), the Agence Nationale de la Recherche (ANR

Nanobiotechnologies; no. ANR-10-NANO-0002-09), the SIRIC CARPEM and canceropole funding (no.

RESEARCH ARTICLE

Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations

Eleonora Zonta¹*, Fanny Garlan¹, Nicolas Pécuchet^{1,2}, Karla Perez-Toralla¹, Ouriel Caen¹, Coren Milbury⁴, Audrey Didelot¹, Elizabeth Fabre^{1,2}, Hélène Blons^{1,3}, Pierre Laurent-Puig^{1,3}, Valérie Taly¹*

1 Université Sorbonne Paris Cité (USPC), INSERM UMR-S1147, CNRS SNC 5014, Centre Universitaire des Saints-Pères, Paris, France, 2 Medical oncology, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France, 3 Department of Biochemistry, Unit of pharmacogenetic and molecular oncology, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France, 3 Department of Biochemistry, Unit of pharmacogenetic and molecular oncology, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France, 4 RainDance Technologies, Billerica, Massachusetts, United States of America

* valerie.taly@parisdescartes.fr (VT); eleonora.zonta@parisdescartes.fr (EZ)

Abstract

In cancer research, the accuracy of the technology used for biomarkers detection is remarkably important. In this context, digital PCR represents a highly sensitive and reproducible method that could serve as an appropriate tool for tumor mutational status analysis. In particular, droplet-based digital PCR approaches have been developed for detection of tumorspecific mutated alleles within plasmatic circulating DNA. Such an approach calls for the development and validation of a very significant quantity of assays, which can be extremely costly and time consuming. Herein, we evaluated assays for the detection and quantification of various mutations occurring in three genes often misregulated in cancers: the epidermal growth factor receptor (EGFR), the v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) and the Tumoral Protein p53 (TP53) genes. In particular, commercial competitive allele-specific TaqMan

R PCR (castPCR™) technology, as well as TaqMan

R and ZEN™ assays, have been evaluated for EGFR p.L858R, p.T790M, p.L861Q point mutations and in-frame deletions Del19. Specificity and sensitivity have been determined on cell lines DNA, plasmatic circulating DNA of lung cancer patients or Horizon Diagnostics Reference Standards. To show the multiplexing capabilities of this technology, several multiplex panels for EGFR (several three- and four-plexes) have been developed, offering new "ready-to-use" tests for lung cancer patients.

Introduction

Droplet-based digital PCR (dPCR) represents an increasingly applied method for quantification and detection of nucleic acids [1]. This technique is based on the compartmentalization and amplification of single DNA molecules into up to millions of individual identical



2011-1-LABEL-UP5-2). Eleonora Zonta receives salary through the INSERM Physicancer program (no. PC201423), Fanny Garlan thanks the Fondation Servier for a fellowship within the Frontiers in Life Science PhD program (FdV). Karla Perez-Toralla receives salary through the Merieux Institution (Merieux Institute Advanced research Grant to VT/ PLP). Ouriel Caen receives salary through the the Association pour la recherche contre le cancer (ARC, no. SL220100601375). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Coren Milbury is employed by RainDance Technologies. RainDance Technologies provided support in the form of salary for author CM, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific role of this author is articulated in the 'author contributions' section.

Competing Interests: CM: RainDance Technologies employee. EF: honoraries from Roche, Boehringer Ingelheim. HB: honoraries from Astra, Boehringer Ingelheim, Merck, Amgen. PLP: honoraries from Astra-Zeneca, Boehringer Ingelheim, Amgen, Integragen Roche, Sanofi. VT: honoraries from RainDance Technologies, Boehringer Ingelheim. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials. compartments (droplets here), so that each compartment contains either zero or one copy of the target DNA following a Poisson distribution [2, 3]. After allele-specific PCR reaction in presence of fluorogenic probes, the counting of positive and negative events reveals the number of copies of target DNA initially present in the tested sample (Fig 1). The sensitivity of dPCR is limited mainly by the number of droplets that can be analyzed and the false positive (FP) rate of the mutation detection assay [4]. Thanks to its higher sensitivity and accuracy in comparison to traditional PCR analysis methods, dPCR is increasingly applied in clinical research for diagnostic, prognostic and predictive evaluation of the disease [5–7].

One of the most attractive fields of dPCR application is cancer research [8, 9]. Due to its ability to quantify small amounts of mutated DNA molecules (MUT) among a large number of wild-type molecules (WT, non-mutated), this technique permits the detection of rare or low abundant alleles in cancer patient samples [10, 11]. In particular, dPCR allows the detection of mutations in circulating tumor DNA from liquid biopsy (e.g. blood plasma, serum, urine) [12, 13], enabling a non-invasive approach for accurate monitoring of disease progression and treatment efficacy [7].

Strategies based on dPCR generally share similar workflow consisting of, first, the identification of at least one target mutation in the patient tumor and, secondly, the specific detection of the identified mutation(s) to evidence the presence of circulating tumoral DNA (ctDNA) [14]. In this context, due to the high quantity of potential cancer specific mutations, there is a constant need for new and "ready-to-use" assays. The assays should allow to track mutated allele with high sensitivity and quantitativity permitting the follow-up of the evolution of a patient's cancer. Many commercial quantitative PCR (qPCR) assays have been developed, and their optimization for dPCR could represent a strong benefit for cancer diagnostic and research.

Lung cancer is the first leading cause of death worldwide (more than one million and half deaths in 2012 [15]). The most recurrent genetic alterations in non-small cell lung cancer (NSCLC, 85% of lung cancers) consist of mutations in the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene, leading to uncontrolled cellular proliferation, inhibition of apoptosis and thus, tissue growth and cancer. The most common mutations of *EGFR* are located in exons 18, 19, 20, 21 of its Tyrosine Kinase (TK) domain (Fig 2A). Gefitinib (Iressa®) and Erlotinib (Tarceva®) are first-line selective inhibitors of EGFR TK domain (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKI), and are effective in NSCLC population of patients [16, 17]. In this context, it has been established that some mutations in the *EGFR* gene are responsible for sensitivity or resistance to these treatments [18, 19]. The missense point mutation p.L858R (c.2573T>G) in exon 21 and the in-frame deletion in exon 19 account for almost 80% of all clinically important mutations related to TKI sensitivity [20]. Another point mutation in EGFR exon 21 present in 2% of NSCLCs is p.L861Q (c.2582T>A) [21]. Importantly, the "second-site" point mutation p. T790M (c.2369C>T) in EGFR exon 20 can emerge during treatment and confers drug resistance to tumor cells [6, 22].

Another worldwide common cancer is colorectal cancer, where 40% of colorectal adenocarcinoma are *KRAS* (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)-mutated (Fig 2B) [5, 23]. It has been demonstrated that only patients with WT *KRAS* tumors benefit from anti-EGFR monoclonal antibodies treatment in colorectal cancer, while *KRAS* mutations confer resistance to anti-EGFR therapy [5, 24, 25]. Moreover, *KRAS* mutated subclones have been highlighted in several adenocarcinomas by different studies [26, 27]. Hence, analysis of *KRAS* mutational status became crucial for therapy design [8, 28].

Finally, we focused on *TP53* (tumor protein p53), a frequently mutated gene in cancer, being altered in approximately 50% of human malignancies [29]. We characterized two assays for common mutations of this oncogene, p.R213^{*} (c.637C>T) in exon 6 and p.R273H (c.818G>A) in exon 8 of *TP53* gene (Fig 2C) [30, 31].



Fig 1. Experimental workflow for picoliter droplet-based digital PCR. An aqueous phase containing PCR reagents, probes, primers and genomic DNA (fragmented if using DNA extracted from cell culture or frozen tissues) is partitioned into droplets using the RainDrop® Source machine (RainDance Technologies, Billerica, US). After thermal-cycling, droplets are re-injected into RainDrop® Sense instrument, permitting the fluorescence detection of each individual droplet. Analysis is finally performed using the RainDance Technologies Analyst software. Empty droplets correspond to droplets containing no targeted DNA. *WT*, *droplets containing wild-type DNA; MUT, droplets containing mutant DNA*.

doi:10.1371/journal.pone.0159094.g001

Herein, we optimized and compared different assays (including commercial ones) for main mutations in *EGFR*, *KRAS* and *TP53* genes by a digital PCR approach. The standardization of procedures for mutations detection could serve as an appropriate tool for tumor mutational evolution analysis.

Materials and Methods

Control DNA and cell lines

EGFR-mutant lung adenocarcinoma H1975 (c.2369C>T, p.T790M and c.2573T>G, p.L858R) and H1650 (del E746-A750) cell lines, *KRAS*-mutant A427 (c.35G>A, p.G12D) and LS123 (c.34G>A, p.G12S) cell lines, *TP53*-mutant HT-29 (c.818G>A, p.R273H) cell line were purchased from ATCC (Manassas, VA 20110, US). Cell lines bearing *EGFR* mutations were genotyped to confirm the presence of targeted mutations using Sanger sequencing (data not shown).

TP53-mutant DNA isolated from the SW-648 cell line (p.R213*, c.637C>T) was purchased from Cell Lines Service (CLS) Company (Eppelheim, Germany).

For p.L861Q (c.2582T>A) EGFR assay, a paraffin-embedded tissue was obtained from a patient with metastatic lung cancer (George Pompidou Hospital, Paris, France) in accordance with Cancer Institute recommendations.

Horizon DiagnosticsTM cfDNA, Multiplex FFPE and Multiplex gDNA Reference Standards were used for multiplex developments.

For details about cell lines and reference standard, refer to S1 Fig.

Human blood samples and plasma isolation

Blood samples were collected from a cohort of patients with lung cancers (stade IIIB and IV). A written informed consent was obtained for all patients included in the study. The protocols for the use of blood samples were approved by the Ethic Commitee (CPP Ile-de-France II, n° 2013-06-21 SC). Four mL of blood were collected in EDTA tubes. The blood was centrifuged at 2,000g at room temperature for 15 minutes. Plasma were stored at -20°C and centrifuged a second time at 2,000g at room temperature for 15 minutes in an Eppendorf 5430R centrifuge before DNA extraction.

Plasma samples in EDTA tubes from healthy donors have been purchased from Biological Speciality Corporation (Bristol, PA 19007, US). DNA samples coming from two females (one non-smoker) and two males (one non-smoker) donors have been extracted as described in the next section from 2 mL of plasma.



Fig 2. Mapping of most frequent EGFR, KRAS and TP53 mutations. In EGFR gene (A), most of the mutations occur within Tyrosine Kinase (TK) domain (in light green, those associated with drug resistance). In KRAS (B), the most frequent mutations are located in exon 2 (corresponding to its GTP binding domain), while in TP53 (C) they are mainly located in its DNA binding domain. In bold, mutations targeted in the study.

doi:10.1371/journal.pone.0159094.g002

DNA extraction and fragmentation

Cell line DNA (from around three millions of cells) was extracted using QIAamp® DNA Mini Kit, while DNA from FFPE samples (patient's sample or Multiplex FFPE Reference Standards) was isolated with QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. DNA from cell lines and DNA from FFPE samples were eluted in 200 μ L or 100 μ L of elution buffer, respectively.

Cell-free DNA [12] (cfDNA) was extracted from plasma samples using QIAmp[®] Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions, and resuspended into 50 μ L of elution buffer.

The DNA quantity has been measured by Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Qubit[®] dsDNA BR Assay kit for DNA from cell lines and HS Assay kit for cfDNA—Life Technologies-Thermo Fisher Scientific, Saint Aubin, France) [<u>32</u>].

All DNA used in the study were kept at -20°C before use.

Genomic wild-type and mutated DNA were fragmented with S220 Focused-Ultrasonicator sonicator (Covaris, Woburn, MA) to mean sizes of 600–800 base-pairs (bp). DNA sizes have been verified by LabChip® GX/GXII Microfluidic system (Perkin-Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) using DNA assay 5K reagent kit (Perkin-Elmer, Villebon-sur-Yvette, France).

qPCR bulk assays

Quantitative PCR on DNA extracted from patient samples and control DNAs were run in a final volume of 10 μ L in 384 wells plate using the reagents final concentrations presented in <u>S2 Fig</u>, including final 1X castPCRTM assay, 0.2 and 0.8 μ M for TaqMan® probes and primers, respectively, and 0.2 and 0.4 μ M for ZENTM probes and primers, respectively. Runs were performed on an ABI Prism 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the thermo cycling conditions shown in <u>S5 Fig</u>. Results were analyzed with the SDS 2.3 software.

NGS analysis and protocol

Sequencing libraries were prepared from cfDNA using Ion AmpliSeq[™] Colon and Lung Cancer Research Panel V2 (Life Technologies-Thermo Fisher Scientific), following the manufacturer's recommendations. The multiplex barcoded libraries were generated with Ion AmpliSeq Library kit v2 (4480442) from six µL of plasmatic cell-free DNA as input. Libraries were normalized using the Ion Library Equalizer kit (4482298). The pooled barcoded libraries (max. 96) were processed on an Ion Chef[™] System using an Ion PI Hi-Q Chef Kit (A27198) and sequenced on an Ion Proton[™] System using and an Ion PI Chip Kit v3 (A26771). The FASTQs sequencing data were processed and aligned to the human genome (hg19) using the Ion-Torrent Suite V4.2.1. We then applied the Base Position Error Rate method that detects mutations in a tested sample using a binomial test to compare at each base position the A,T,C,G, insertion and deletions counts with those obtained in 29 control samples. Among all tested base position in one sample, mutations were called for the most statistically significant positions determined with logit and adjusted boxplot outlier detection methods (manuscript under review).

Picoliter droplet based digital PCR: emulsion generation, thermal-cycling and droplets analysis

All PCR assay mixes were prepared as shown in <u>S2 Fig</u> in a pre-PCR room to limit risks of contamination. CastPCR^{**}, TaqMan® (both from Life Technologies-Thermo Fisher Scientific) and ZEN^{**} (Integrated DNA Technologies, Louvain, Belgique) probes were tested. In classic TaqMan® assay, the probe bearing VIC-fluorophore (λ_{ex} 538 nm / λ_{em} 554 nm) was designed to be specific to the WT allele, while the probe bearing FAM-fluorophore (λ_{ex} 494 nm / λ_{em} 518 nm) was able to specifically hybridize to the mutated sequence (S3 Fig presents the details for each assay). ZEN[™] technology uses hydrolysis of double-quenched fluorogenic probes, with one probe bearing TET-fluorophore (λ_{ex} 521 nm / λ_{em} 536 nm) specific for the WT allele, and one probe bearing FAM-fluorophore for the mutated sequence (similarly to TaqMan[®]) assays). With castPCR[™] technology, the specificity to the mutated locus (if present) is determined by the primer, while a blocker is impeding probe's hybridization to WT allele; a classic TaqMan[®] probe distant-located from targeted mutation is used as a reference for quantification of total target DNA (refer to <u>S4 Fig</u> for the description of these mutation detection assays). It is to note that we modified the classic castPCR[™] protocol that permits to use probes bearing only FAM-fluorophore in a two-wells bulk analysis where mutant allele is tested in a single well and the total target DNA in another well. The use of a VIC-fluorescent assay targeting both alleles in a non-mutated common region and a FAM-fluorophore for the mutated allele, permitted to analyze simultaneously WT and MUT targets in one assay. This improvement permitted to handle qPCR experiments in one-well analysis, as well as to implement dPCR multiplex tests by varying probes concentrations.

DNA was added to the mix in a separate room, after been fragmented with S220 Focused-Ultrasonicator sonicator in order to avoid DNA viscosity and thus contingent coalescence. For cell-lines or FFPE extracted DNA, 20 to 60-nanograms (ng) were used. PCR reactions were prepared to final 25 μ L volume, containing from 300 to 800 DNA copies/ μ L for cell lines DNA (except for the 0.01% dilution where 50 μ L emulsions have been used). For plasma DNA, three to six μ L of eluted sample was used per reaction, independantly of the DNA amount.

The mix was compartmentalized into droplets with the droplet generator RainDrop \mathbb{R} Source (RainDrop \mathbb{R} Digital PCR System, RainDance Technologies, Billerica, US) for production of five picoliter (pL)-droplets partitioning DNA into approximately five or ten million droplets dependent upon starting sample volume (occupancy rate $\lambda \approx 0.001$ and 0.004 when applying 20 or 60 ng of DNA, respectively). Emulsions were collected into eight-strip PCR tubes (Axigen, VWR, Fontenay sous bois, France). The samples were thermal-cycled (refer to S5 Fig for thermocycling programs) using a BioRad \mathbb{R} thermal cycler (MJ-Mini, S1000, or C1000 touch). Finally, samples were sealed with opaque flat caps (RainDance Technologies, Billerica, US) and transfered to the RainDrop \mathbb{R} Sense instrument (RainDance Technologies, Billerica, US). Lasers within the RainDrop system are used to excite and read the FAM and VIC/TET fluorescence intensity of droplets. Data were then analyzed using the RainDrop Analyst data analysis software. For all dPCR experiments, droplets events have been normalized to five or ten milions droplets (the partition number theoretically expected), and the number of mutated-DNA containing droplets has been re-calculated after substraction of the Limit of Blank (LOB), typical of each probe.

For description of multiplex mutation detection assays, refer to <u>S6 Fig</u>.

Statistical analysis

In conditions of limiting dilution, the distribution of DNA molecules has been shown to follow a Poisson statistics [3]. As a consequence, all events including FP counts follow this statistics, supposing that the number of FP should not change if using greater amount of input DNA as previously described [8]. The LOB and the Limit of Detection (LOD) of our assays could thus be determined using a Poisson statistical analysis as described by Milbury *et al* [33]. Statistical analysis were performed on Excel and Prism software (GraphPad Software, Inc.). Mutation titration series have been analyzed on MatLab. All data are presented in order to follow digital PCR MIQE guidelines [1].

Results and Discussion

Verification of linearity and sensitivity of the assays

Digital PCR has emerged as a highly effective technique for evaluation of tumor patients' status. Thanks to its sensitivity, this method permits detection and quantification of rare sequences from low amount of starting material. Notably, droplet-based digital PCR allows the detection of mutations in circulating tumor DNA from liquid biopsies [34]. Nevertheless, the detection of different mutations demands the development of various assays, that should allow specific detection and quantification of each mutation. To avoid high costs and efforts associated with such developments, "ready-to-use" assays should be of high interest. Besides, these tests could as well broaden dPCR handling to non-expert users.

We thus assessed the utility and relevance of castPCR[™] technology, recently developed by Life-Technologies-Thermo Fisher Scientific Company, compared to conventionaly used Taq-Man® system for various *EGFR*, *KRAS* and *TP53* mutations [28]. We first tested them on fragmented DNA extracted from cell line harboring the corresponding mutations. In parallel, the assay has been run on fragmented WT genomic DNA for determination of the number of FP droplets (if present) of each assay.

An example of analysis obtained using EGFR p.L858R castPCR[™] and TaqMan[®] is shown in <u>Fig 3</u> (left and right panel respectively). In the tables present under the figures, the molecule count is listed. Input DNA was theoretically 20 ng for five millions of droplets. The amount of genomes (WT-containing droplets in WT DNA sample) obtained was similar for both assays (between 5000 and 6000 genomes). When looking to the results in mutated H1975 cell line DNA, we obtained almost the same amount of MUT-containing droplets (around 4000 molecules) with both assays. The number of WT+MUT -called "Reference" for the castPCR[™] testand WT containing droplet counts were also in agreement: 5000 molecules for (WT+MUT)containing droplets with the castPCR[™] test and 1000 for WT-containing droplets with the



Fig 3. Examples of EGFR L858R castPCR[™] and TaqMan (® **asssays.** Plots obtained from dPCR analysis using EGFR L858R castPCR[™] assay (panels A and B) and TaqMan (® assay (panels C and D). As negative and positive controls, fragmented human wild-type genomic DNA (A and C) and H1975 cell line genomic DNA (B and D) have been used, respectively (see <u>S6 Fig</u> for probes/primers concentrations). In the lower tables, droplets counts from these experiments are listed. Input ng represents the amount of DNA used in dPCR, previously estimated by Qubit (® 2.0 Fluorometer. *A.U, arbitrary units; WT, wild-type; Reference, wild-type + mutant DNA; gDNA, genomic DNA*.

doi:10.1371/journal.pone.0159094.g003

PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0159094 July 14, 2016
TaqMan[®] assay. The difference in the number of counts for the red-bearing fluorescent droplets is justified by the different technical operating principle of these two detection systems. Indeed, within the classic TaqMan[®] assay fluorescent probes are specific for the WT or the MUT sequence (both placed in exon 21 around p.L858R mutation): we obtained 4000 mutated molecules and 1000 WT-DNA containing droplets. Within castPCR[™] system, a first set of primers and probes is directed specifically to the targeted mutation (with primers specific for p. L858R point mutation and a blocker of WT sequence, obtaining 4000 mutated molecules) and a second one targets a remote region (in exon 17) common to both WT and MUT sequences (thus detecting 5000 molecules, which is exactly the total amount of WT- and MUT-DNA containing droplets within the TaqMan[®] assay).

Furthermore, we noted that, for this particular assay, when using the L858R TaqMan[®] assay the cluster obtained was more stretched than the one obtained with castPCR[™] probes (Fig <u>3C and 3D</u>). In order to verify the pertinence of droplets counting, we designed a small (wild-type or L858R "1") and a bigger cluster (wild-type or L858R "2") and compared the number of genomes obtained with both designs. Since the counts and the percentage of mutation obtained were nearly similar, we concluded that we could take into account the small ("1") cluster only.

With these assumptions, for the p.L858R detection, we evaluated castPCR[™] test as more specific than TaqMan® systems, both for its specificity (determined by the WT-blocker and by the implementation of a reference assay far-away located from the analyzed mutation) and for clusters shape (which resulted easier to define compared to the stretched clustering of Taq-Man® assay). Yet, castPCR[™] test performance depends on targeted mutation/gene (i.e. both for KRAS p.G12S and TP53 p.R273H mutations the TaqMan® assay shown higher efficiency then castPCR[™] test).

For the p.T790M resistance mutation of EGFR, we compared the castPCR^{\cong} with the ZEN^{\cong} assay (see Milbury *et al.* [33]), consisting of a LNA PrimerTime® dual-labeled DNA probe with two quenchers (S4 Fig). As shown by mutation titration series presented later in the text, ZEN^{\cong} assay demonstrated higher sensitivity (up to 0.01%) than the castPCR^{\cong} assay.

In <u>S7 Fig</u>, the comparison between castPCR[™] and TaqMan® assays is shown for p.G12S mutation of KRAS, and p.R273H mutation of TP53.

Five other most frequent mutations of KRAS (p.G13D, p.G12V, p.G12R, p.G12A, p.G12C) were tested with both castPCR[™] and classic TaqMan[®]. Some castPCR[™] assays targeting less frequent mutations (p.Q61Q, p.Q61H, p.A146T for KRAS, p.G469A for BRAF and p.Q61R for NRAS, not available with TaqMan[®] system) were also validated by dPCR in a context of clinical follow-up (data not shown). Furthermore, we tested castPCR[™] technology for three other common mutations of TP53 (p. R175H, p.R248Q, p.R273C) and obtained results comparable to the one described for p.R273H and p.R213^{*} (data not shown). From these testings, we could conclude that classic TaqMan[®] technology rather than castPCR[™] was a better option for the described dPCR assays, due to lower FP rate (refer to Fig 4).

Subsequently, to evaluate the sensitivity of each assay, we determined the mean FP droplet event frequency from a series of wild-type-only control samples (where the FP corresponds to the number of droplets that fall into the MUT-containing droplet cluster in a non mutated sample, which *a priori* should not present those events) (refer to supplementary data from [8] and [33]).

For these determination, we performed multiple experiments on a set of WT genomic DNA samples, ranging from 20 to 60 ng of starting DNA material, supposing that the number of FP should not change if using greater amount of input DNA (as previously described [8]).

For most assays, FP rate did not varied relative to the quantity of input DNA, except for castPCR[™] assays targeting EGFR p.T790M, TP53 p.R273H and p.R213* where we observed a higher FP rate if using 60 ng-input (Fig 4). A possible explanation, at least for T790M castPCR[™] assay, is the difficulty of primer design around this point mutation. Though, it is known that





Fig 4. False-positive evaluation in negative controls (human wild-type genomic DNA). In order to assess the false-positive (FP) events detected in negative control samples, we analysed by dPCR a collection of human wild-type only samples (genomic DNA, refer to S1 Fig for details) with the EGFR, KRAS and TP53 assays described. We used two different amounts of DNA input (20 and 60 ng, depicted by circles and squares respectively). The scatter plot displays the low dynamic range detection of three castPCRTM probes (EGFR p.T790M, TP53 p.R273H and p.R213*), where the number of FP events increased when using 60 ng of starting DNA material (lines represent the mean for each assay). At right, the table shows the LOB and LOD estimation of all assays (refer to [33] for precise *formula*), calculated from the λ_{FP} of each test (where λ_{FP} is given by the mean number of false-positives obtained in all experiments realized with 20 ng input DNA). Mean value and standard deviation for each FP measurement for the different assays are shown, both for WT and MUT-DNA containing droplets. (*C*), *castPCRTM probes; N°, number; FP, false-positive; LOB, Limit of Blank; LOD, Limit of Detection; N/A, not applicable.*

doi:10.1371/journal.pone.0159094.g004

the region of interest is GC-rich. Moreover, it contains a single nucleotide polymorphism eight nucleotides upstream the mutation site and a repetitive sequence element close to it. However, for the p.T790M assay using ZEN[™] technologies, previously described by Milbury *et al.* [33], the number of FP was independent of DNA amount (see Fig 4).

After this observation, for the assay where the FP did not varied in function of the quantity of input DNA, a Poisson model was fit to the data with a parameter, λ , which is the mean of the Poisson distribution, and evaluating the 95% one-tailed upper limit of the model distribution.

From λ_{FP} , we calculated LOB and LOD for all the assays (for further information on statistical analysis, refer to [33]). These metrics were useful for description of sensitivity of our tests (right panel in Fig 4). In particular, LOB was helpful for evaluation of mutation percentage, as samples were considered positive when the number of observed droplets was higher than LOB value for the considered test. Yet, this was possible only when FP rate was not depending from input DNA amount (LOB calculation was not possible–N/A in table of Fig 4– for castPCR^{**} assays targeting EGFR p.T790M, TP53 p.R273H and p.R213^{*}).

A mutation titration series was then performed in duplicate or triplicate for evaluation of linearity and sensitivity of assays. For each test, we diluted DNA from corresponding mutated cell line in WT DNA, up to 0.01%. Higher dilutions were not tested further to be coherent with the amount of input DNA expected from clinical samples. Data are shown in Fig.5 for EGFR assays, in Fig.6 for KRAS, and in Fig.7 for TP53 assays. All assays are globally sensitive up to the last titration sample (0.01%), except for the castPCR[™] tests targeting EGFR p.T790M, TP53 p.R273H and TP53 p.R213^{*}, which have a sensitivity limited at 0.1%. Despite numerous experiments we performed in order to improve those tests, we could not gain in sensitivity.

The mean droplet counts from independent experiments for each mutation titration test are listed in <u>S8 Fig</u>.

Test of EGFR assays on patient samples and implementation of multiplex formats

Following characterization of EGFR castPCR[™] tests, we evaluated their applicability on eight plasma DNA of lung cancer patients (stade III and IV). Mutation present in the tumor has





Fig 5. Examples of titration series with EGFR castPCR[™], ZEN[™] and TaqMan[®] probes. Serial dilutions of L858R, T790M, Del19, or L861Q mutated DNA (extracted from H1975 cell line, H1650 cell line or FFPE tissue, respectively) in human wild-type genomic DNA. Individual data points are displayed for independent replicates. The expected mutant to wild-type ratio (black line) is shown. Green continuous and dashed lines represent LOB and LOD values, respectively, evaluated from droplets falling into the mutated-DNA cluster and analyzed in a WT gDNA sample for each replicate. For the lowest titration point (0.01%), we used a higher amount of input DNA. Thus, corresponding LOB and LOD values are represented by red lines. Since number of FP was increasing with quantity of input DNA for EGFR p.T790M castPCR[™] test, LOB and LOD calculation could not be performed (refer to [8]).

doi:10.1371/journal.pone.0159094.g005

been determined by Next Generation Sequencing (NGS) at the Georges Pompidou Hospital (Ion-Torrent, Thermo-Fischer, and AmpliSeq Colon and Lung cancer panel v2). Two plasmatic DNA samples have been tested for each mutation with the duplex panel (Fig.8). Three to six μ L of DNA, whose amount has been previously estimated by Qubit (R HS kit (from 3.7 to 45.3 ng, as shown in the lower table of Fig.8), were used as input for the test. Different percentages of mutated alleles have been obtained for each patient (from 0.53% to 23.44%). It has to be noted that the position of Del19 cluster could shift, probably depending on the number of nucleotides deleted in each sample (Deletions19 assay is a pool of nineteen different deletions on the *EGFR* exon 19).

The castPCR[™] assays were run in a bulk qPCR experiment using the same DNA samples. As shown in <u>S11 Fig</u>, over the eight samples detected positive by dPCR, only four samples could be detected by qPCR, reflecting the fact that dPCR represents a powerful tool for detection of low mutation load in tumor samples.





Fig 6. Examples of titration series with KRAS castPCR[™] and TaqMan[®] probes. Serial dilutions of G12D and G12S mutated DNA (extracted from A427 and LS123 cell lines, respectively) in human wild-type genomic DNA. Individual data points are displayed for independent replicates. The expected mutant to wild-type ratio (black line) is shown. Green continuous and dashed lines represent LOB and LOD values, respectively, evaluated from droplets falling into the mutated-DNA cluster and analyzed in a WT gDNA sample for each replicate. For the lowest titration point (0.01%), we used a higher amount of input DNA. Thus, corresponding LOB and LOD values are represented by red lines.

doi:10.1371/journal.pone.0159094.g006

Besides, we tested EGFR Del19 assay on samples harboring different deletions for veryfing the specific targeting of this assay. We tested circulating DNA extracted from four plasma of lung cancer patients, which presented deletions of three, four, five or six amino acids. Three µL



Fig 7. Examples of titration series with TP53 castPCR[™] and TaqMan® probes. Serial dilutions of TP53 p.R273H and p.R213* mutated DNA (extracted from HT-29 and SW-684 cell lines, respectively) in human wild-type genomic DNA. Individual data points are displayed for independent replicates. The expected mutant to wild-type ratio (black line) is shown. Green continuous and dashed lines represent LOB and LOD values, respectively, evaluated from droplets falling into the mutated-DNA cluster and analyzed in a WT gDNA sample for each replicate. For the lowest titration point (0.01%), we used a higher amount of input DNA. Thus, corresponding LOB and LOD values are represented by red lines. Since number of FP was increasing with quantity of input DNA for TP53 p.R273H and p.R213*castPCR[™] test, LOB and LOD calculation could not be performed (refer to [8]).

doi:10.1371/journal.pone.0159094.g007

PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0159094 July 14, 2016



	EGFR L858R castPCR TM probe		EGFR L861Q castPCR™ probe		EGFR Del19 castPCR™ probe		EGFR T790M ZEN TM probe	
	Patient n°1	Patient n°2	Patient n°3	Patient n°4	Patient n°5	Patient n°6	Patient n°7	Patient n°8
Wild-type DNA-containing droplets	464	3579	610	1165	2262	800	5104	124
Mutated DNA-containing droplets	12	46	143	216	12	11	278	12
Input ng	15,5	16,5	3,7	5,6	20,5	4,90	45,3	8,90
of mutated DNA (calculated by dPCR)	2.59%	1.29%	23.44%	18.54%	0.53%	1.38%	5.17%	8.82%
6 of mutated DNA (calculated by NGS)	1.1%	0.6%	17.5%	13.3%	0.7%	0.0%	NA	0.0%

Fig 8. EGFR L858R, L861Q, Del19 and T790M mutation screening on lung cancer patients plasma using dPCR two-plex assay. Two-plots analysis on plasma DNA samples, whose initial tumor specific mutation has been previously determined by NGS on the tumor tissue. In the table, event counts from each experiment are listed. Input ng represents the amount of DNA used in dPCR, previously estimated by Qubit[®] 2.0 Fluorometer (three µL were used for each sample). Measured allelic frequencies are given for dPCR and NGS analysis. *Reference, wild-type* + *mutant DNA; NA, not analyzed; A.U, arbitrary units.*

doi:10.1371/journal.pone.0159094.g008

of DNA were used as input for the test (from 6 to 48 ng total). Two-plex plots of digital PCR experiments are shown in Fig 9. Percentage of mutated DNA was different in all samples, depending on tumor heterogeneity, on treatment line and time between blood sampling and start of treatment (plasma from patient 1 and 2 have been sampled at the beginning of the treatment; for patient 3, eight weeks after beginning of the treatment, while for patient 4, three weeks after beginning of the treatment) [35-37].

In this context, castPCR[™] L858R, L861Q, Del19 and ZEN[™] T790M assays have been successfully tested on ctDNA from plasma of lung cancer patients in a clinical study that will be submitted soon.

Furthermore, Fig 10 describes multiplex assays for the most recurrent *EGFR* mutations (for final concentrations and vendors of reagents used for multiplex test development, refer to <u>S2</u> Fig for mix components and to <u>S6 Fig</u> for probes/primers concentrations–"four-plex assay panel"). Panel A, B and C show three-plex assays targeting the wild-type sequence, either one of the three sensitivity mutations (p.L858R, p.L861Q, Del19) as well as the resistance mutation



Fig 9. EGFR Del19 screening on lung cancer patients plasma using two-plex assay. These four plots were obtained from dPCR analysis on DNA extracted from plasma of lung cancer patients. The use of Del19 castPCRTM probe permitted to screen samples containing different deletions on exon 19 (of three, four, five and six amino acids, in panel A, B, C, D, respectively). In the table, event counts from the single experiments are listed. Input ng represents the amount of DNA used in dPCR, previously estimated by Qubit (\mathbb{R} 2.0 Fluorometer (three µL were used for each sample). Measured allelic frequencies are given for dPCR and NGS analysis. *Reference, wild-type + mutant DNA; NA, not analyzed; A.U, arbitrary units; AA, aminoacids*.

doi:10.1371/journal.pone.0159094.g009

p.T790M. Panel D presents a four-plex assay targeting the wild-type sequence, the two most recurrent sensitivity mutations of EGFR (p.L858R and Del19, accounting for around 80% of all mutations) and the p.T790M resistance alteration. A mixture of distinct probes at various concentrations permitted to isolate clusters corresponding to the presence of each mutation [8, 38] (refer to S6 Fig). A pool of DNA consisting of DNA extracted from the two cell lines H1975 and H1650, FFPE sample and genomic WT-only DNA was used as input for multiplex assays. As control, we performed the four-plex analysis on a pool of DNA, taking off the DNA from H1975 (S9A Fig) or DNA from H1650 (S9B Fig). Since the false positive occurrence and background signal differ in those panels from the corresponding duplex analysis, we calculated the LOB and LOD values for all multiplex test (S10 Fig).

Moreover, DNA from healthy subjects has been analyzed with the developed EGFR assay panels. While no MUT-containing DNA has been detected when using the duplex panel (except for one sample–M-NS-01 in L858R panel–; still its mutated allelic fraction was lower than LOD value), we noticed some background for three and four-plex tests (<u>S11 Fig</u>).

DNA samples previously analyzed using the two-plex assays (refer to $\underline{Fig 8}$) were also tested using the multiplex assays. The allelic fractions calculated from this new analysis were comparable to the one observed by two-plex analysis. The fact that we observed a small discrepancy









Fig 10. Multiplex assays for the most frequent EGFR mutations. In panel A, B and C, 2D-plots of the three-plex for follow up of the three sensitivity mutations with the T790M resistance mutation. The four-plex is shown in panel D. A pool of fragmented DNA extracted from two cell lines (H1975 harboring L858R and T790M mutations, H1650 harboring Del19 mutation), DNA from FFPE sample (for L861Q mutation) and fragmented wild-type only genomic DNA was used as input. A mix of mutation-specific VIC and/or 6-carboxyfluorescein cast™ and ZEN™ probes was optimized. In the table, event counts from the single experiments are listed (input ng represents the amount of DNA used in dPCR, previously estimated by Qubit ® 2.0 Fluorometer). *A.U., arbitrary units; WT, wild-type;* S, sensitivity mutation; R, resistance mutation.

doi:10.1371/journal.pone.0159094.g010

between the mutation load obtained when using the different panels can be justified by the higher background signal of three/four-plex when compared to the two-plex tests. In the case of the Del19 multiplex, it has to be underlined that a better quality in terms of clusters separation could potentially have been obtained using a Del19 castPCR[™] assay bearing a VIC fluorophore (not commercially available at the time of manuscript writing). Moreover, since the assay is ready-to-use, we could not change primers and probes concentrations separately for improve clusters spatial resolution.

Even if optimization could be performed on these assays, such multiplex panels would be pertinent for the simultaneous detection of different alterations, meanwhile consuming a minimum quantity of patient sample [8]. Moreover, they might allow the detection of resistance mutation T790M while measuring the sensitivity one at the same time (S11 Fig). Furthermore, these multiplexed assays can not be tested by classic bulk experiments in just one assay.

Confirmation of multiplex assays on commercially available DNA

In the interest of further confirming the pertinence of the developped multiplex assays, we ran the three-plex assays containing p.L858R or p.L861Q or Del19 and p.T790M mutations on three different EGFR Horizon Diagnostics (HDx[™]) Reference Standards (<u>S1 Fig</u>). The HD850 EGFR Gene-Specific Multiplex FFPE Reference Standard (with 5% Allelic Frequency) has been manufactured from five engineered *EGFR* mutant cell lines, mixed and formalin fixed-paraffin





EGFR L858R-L	861Q-Del19 castPCR™ prob	e; EGFR T790M ZEN TM prob	be	EGFR L858R-L861Q-Del19 castPCR TM probe; EGFR T790M ZEN TM probe						
	A. 3-plex analysis	B. 3-plex analysis	C. 3-plex analysis		A. 3-plex analysis	B. 3-plex analysis	C. 3-plex analysis			
	WT-L858R(S1)-T790M(R)	WT-L861Q(S2)-T790M(R)	WT-Del19(S3)-T790M(R)		WT-L858R(S1)-T790M(R)	WT-L861Q(S2)-T790M(R)	WT-Del19(S3)-T790M(R)			
Wild-type DNA-containing droplets (WT)	2914	3864	3566	Wild-type DNA-containing droplets (WT)	10605	6460	10769			
Mutated DNA-containing droplets (S1)	140			Mutated DNA-containing droplets (S1)	460	51				
Mutated DNA-containing droplets (S2)		135		Mutated DNA-containing droplets (S2)		736				
Mutated DNA-containing droplets (\$3)			149	Mutated DNA-containing droplets (S3)			435			
Mutated DNA-containing droplets (R)	159	199	125	Mutated DNA-containing droplets (R)	510	867	468			
Input ng	18	18	18	Input ng	40	12	40			
expected % of mutation		5% for each mutation		expected % of mutation	5% for S1 and R	12.5% for S2 and R	5% for S3 and R			
% of mutation (S1, S2 or S3)	4,6%	3,3%	4,0%	% of mutation (S1, S2 or S3)	4,1%	10.0%	3,9%			
% of mutation (R)	5.2%	4.9%	3,4%	% of mutation (R)	4.6%	11.8%	4,2%			

Fig 11. Multiplex panel for the most common EGFR mutations using HdX[™] Reference Standards. A three-plex panel for follow-up of the 3 EGFR sensitivity mutations with the T790M resistance mutation. As input, DNA from FFPE Reference Standards (R.S.) (panels A, B, C), Multiplex I cfDNA (panels D and F) and Multiplex genomic DNA (panel E) from Horizon Diagnostics. The FFPE R.S. contains 50% of genomic DNA and 5% of each mutation, while while the Multiplex DNA is engineered from mutant cell lines for generation of 12.5% EGFR allelic frequency for the four mutations. Multiplex I cfDNA provides a set containing fragmented DNA in a range of low allelic frequencies (from 0.1% to 5%): we showed here only the 5% allelic frequency DNA. In the table, event counts from the single experiments are listed (input ng represents the amount of DNA used in dPCR, previously estimated by Qubit[®] 2.0 Fluorometer). *A.U, arbitrary units; WT, wild-type; gDNA, genomic DNA*.

doi:10.1371/journal.pone.0159094.g011

embedded, in order to generate a precise allelic frequency multiplex sample (5% of p.L861Q, Δ E746 –A750, p.L858R, p.T790M, p.G719S) (Fig 11A, 11B and 11C). The HD780 Multiplex I cfDNA Reference Standard Set was manufactured from engineered human cancer cell lines, and subsequently fragmented to an average size of 160bp to resemble cfDNA from human plasma (Fig 11D and 11F). The HD802 EGFR Gene-Specific Multiplex gDNA Reference Standard has been developed from four engineered *EGFR* mutant cell lines, generating a multiplex sample containing 50% of genomic DNA and 12.5% of p.L861Q (Fig 11E), 12.5% of Δ E746 – A750, 12.5% of p.L858R and 12.5% of p.T790M.

As shown in Fig 10, the obtained percentage of mutated alleles were close to those expected from HdX^{∞} Reference Standard, confirming the feasibility and applicability of the characterized assay.

In conclusion, with this work we report the performance of the developed multiplex assays for various *EGFR*, *KRAS* and *TP53* mutations using the picoliter droplet-based dPCR system. Following the emergent need of rapid and "ready-to-use" tests for diagnostic, our goal has been to characterize three types of technologies, the castPCR[™], TaqMan® and ZEN[™]probes as well as to develop pertinent EGFR multiplex assays. The results described revealed a good sensitivity for several castPCR[™] and all TaqMan® probes. With some probes, we could detect one mutated DNA-containing droplet into 10.000 droplets (0.01% of sensitivity), while other tests (EGFR T790M, TP53 R273H and R213^{*} castPCR[™] assays) showed sensitivity untill 0.1%. Our results also show that these droplet based digital PCR represent a pertinent tool for circulating tumor DNA patients'follow-up and rare mutations detection in cancer research. Finally, this study presents the first multiplex (three-plex and four-plex) panel for the most common sensitivity mutation (p.L861Q, p.L858R and Del19) and the resistance mutation p.T790M. Further validations of these assays should now be performed in a context of a large cancer research study.

Supporting Information

S1 Fig. Cell lines details. For p.L861Q EGFR assay, DNA from tumor collection available in the laboratory has been used (refer to Methods part). For p.R213^{*} (637C>T) TP53 mutation, DNA was directly purchased from Cell Lines Service (CLS) Company. Horizon DiagnosticsTM cfDNA, Multiplex FFPE and Multiplex gDNA Reference Standards have also been tested. (PDF)

S2 Fig. dPCR reagent components.

(PDF)

S3 Fig. EGFR, KRAS and TP53 assays details. Main information about castPCR[™], TaqMan ® and ZEN[™] assays are reported in the tables. The transcripts we refered to are NM_005228.3 for EGFR, NM_033360.2 for KRAS and NM_000546.4 for TP53 gene. * "MGBNFQ" refers to the minor groove binder non-fluorescent quencher; ** Proprietary information of Life Technologies-Thermo Fisher Scientific (sequences of probes and primers are not furnished). (PDF)

S4 Fig. Competitive Allele-Specific Taqman ® PCR (castPCR[™]), Taqman ® Mutation Detection Assays and ZEN[™] Internal Quencher system. CastPCR[™] technology (upper panel) permits specific amplification of one allele type (bringing the mutation) while an MGB blocker suppresses the wild-type sequence (if present) at the mutation site. As reference, a TaqMan ® system permits the amplification of wild-type DNA further away from the targeted mutation (e.g. about 20.000 nucleotides for EGFR probes) (refer to <u>http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/</u> en/home/applications-technologies/real-time-pcr/castpcr.printable.html for more information). The TaqMan ® technology (lower left figure) permits the detection of the mutation by specific match of fluorescent probe with the sequence in which the mutation resides. ZEN[™] Internal Quencher (lower rigth figure) system represents an original modification developed by IDT which helps in lowering background and increasing signal than traditional methods (refer to <u>http://eu.</u> idtdna.com/pages/products/gene-expression/custom-qpcr-probes for further information). (PDF)

S5 Fig. PCR Cycling Conditions. * For KRAS TaqMan® probes, an annealing temperature of 64°C has been used. (PDF)

S6 Fig. Multiplex mutation detection assay description. The amount of probes and primers used for duplex, triplex and quadruplex assays for the three targeted genes is shown. Since

castPCR[™] assays are selt as read-to-use by Life Technologies-Thermo Fisher Scientific company, we could not specify the final concentration (expressed in µM). (PDF)

S7 Fig. Examples of TP53 R273H and KRAS G12S castPCR^{**} and TaqMan (R) assays. Twoplex plots obtained from a single dPCR analysis using KRAS G12S castPCR^{**} assay (panels A and B) and TaqMan (R) assay (panels C and D), and TP53 R273H castPCR^{**} assay (panels E and F) and TaqMan (R) assay (panels G and H). As negative and positive controls, fragmented human wild-type only genomic DNA (A, C, E, G) and DNA from mutated cell lines (B, D, F, H) have been used. In both assays, final concentration of probes was of 1X, except for the VIClabeled probe for TP53 Reference in castPCR^{**} assay which was used at a 0.5X final concentration (for TaqMan (R) assays, 0.8 μ M of primers and 0.2 μ M of probes). In the lower tables, droplets counts from experiments are listed. Input ng represents the amount of DNA used in dPCR, previously estimated by Qubit (R) 2.0 Fluorometer. *Reference, wild-type + mutant DNA; A.U, arbitrary units; gDNA, genomic DNA*. (PDF)

S8 Fig. Table showing events counts of mutation titration series. Mean of two or three replicates is shown. Expected percentage of mutations has been evaluated from the heterozygosity percentage of cell line obtained with each probe. Average and standard deviation for the different replicates are shown, both for WT and MUT-DNA containing droplets. (PDF)

S9 Fig. Controls scatter plots for the four-plex panel for the most common *EGFR* **mutations.** As control for the four-plex panel, the mutation mix has been used on different pools of DNA missing one of two cell lines (A and B panels). In the table, event counts from the single experiments are listed (input ng represents the amount of DNA used in dPCR, previously estimated by Qubit (R) 2.0 Fluorometer). *A.U, arbitrary units; Ctrl, control; WT, wild-type; S, sensitivity mutation; R, resistance mutation.* (PDF)

S10 Fig. False-positive evaluation in negative controls (human wild-type genomic DNA) for multiplex assays. In order to assess the false-positive (FP) events detected in negative control samples, we analyzed by dPCR a collection of human wild-type only samples (genomic DNA, refer to S1 Fig for details) with the multiplex EGFR tests previously described. We used two different amounts of DNA input (20 and 60 ng, depicted by circles and squares respectively). The right table shows the LOB and LOD estimation for all assays (refer to [33] for precise *formula*), calculated from the λ_{FP} of each test (where λ_{FP} is given by the mean number of FP obtained in all experiments realized with 20 ng input DNA). N°, *number; FP, false-positive; LOB, Limit of Blank; LOD, Limit of Detection.* (PDF)

S11 Fig. Comparison of the different assays performed using quantitative and digital PCR. Delta-CT values corresponding to the detection of mutant alleles (qPCR) or fraction of mutant DNA obtained by digital PCR are shown for each EGFR targeted mutation (A. p.L858R; B. p. L861Q; C. Del19; D. p.T790M). Results from healthy controls DNA and from lung cancer patients DNA are listed. Moreover, for each patient bearing a specific mutation, multiplex panel analysis is shown. *WT*, *wild-type; AF, allelic frequency; F, female; F-NS, non smoker female; M, male; M, non smoker male.* (PDF)

Acknowledgments

Conceived and designed the experiments: EZ VT PLP. Performed the experiments: EZ FG KPT NP AD CM. Analyzed the data: EZ FG KPT OC NP CM. Contributed reagents/materials/ analysis tools: NP CM AD HB EF. Wrote the paper: EZ VT PLP.

We acknowledge the help and availability of Dr. Antonio Alberdi and all the team of the Plateforme Technologique of the Institut Universitaire d'Hématologie (IUH, Paris, France) for the use of the S220 Focused-Ultrasonicator sonicator and LabChip® GX/GXII Microfluidic system.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EZ VT PLP. Performed the experiments: EZ FG KPT NP AD CM. Analyzed the data: EZ FG KPT OC NP CM. Contributed reagents/materials/ analysis tools: NP CM AD HB EF. Wrote the paper: EZ VT PLP. Final approval of the manuscript: EZ FG NP KPT OC CM AD EF HB PLP VT.

References

- Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, et al. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. Clinical chemistry. 2013; 59 (6):892–902. Epub 2013/04/11. doi: <u>10.1373/clinchem.2013.206375</u> PMID: <u>23570709</u>.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(16):9236–41. Epub 1999/ 08/04. PMID: <u>10430926</u>; PubMed Central PMCID: PMC17763.
- 3. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. BioTechniques. 1992; 13(3):444–9. Epub 1992/09/01. PMID: <u>1389177</u>.
- Taly V, Pekin D, El Abed A, Laurent-Puig P. Detecting biomarkers with microdroplet technology. Trends Mol Med. 2012; 18(7):405–16. Epub 2012/06/26. doi: <u>10.1016/j.molmed.2012.05.001</u> PMID: <u>22727782</u>.
- Laurent-Puig P, Pekin D, Normand C, Kotsopoulos SK, Nizard P, Perez-Toralla K, et al. Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. Clin Cancer Res. 2015; 21(5):1087–97. Epub 2014/09/25. doi: <u>10.</u> <u>1158/1078-0432.CCR-14-0983</u> PMID: <u>25248381</u>.
- Watanabe M, Kawaguchi T, Isa SI, Ando M, Tamiya A, Kubo A, et al. Ultra-Sensitive Detection of the Pretreatment EGFR T790M Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer Patients with an EGFR-Activating Mutation Using Droplet Digital PCR. Clin Cancer Res. 2015. Epub 2015/04/18. doi: <u>10.1158/1078-0432.CCR-14-2151</u> PMID: <u>25882755</u>.
- Guttery DS, Page K, Hills A, Woodley L, Marchese SD, Rghebi B, et al. Noninvasive Detection of Activating Estrogen Receptor 1 (ESR1) Mutations in Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. Clinical chemistry. 2015; 61(7):974–82. Epub 2015/05/17. doi: <u>10.1373/clinchem.2015.238717</u> PMID: <u>25979954</u>.
- Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. Clinical chemistry. 2013; 59(12):1722–31. Epub 2013/08/14. doi: <u>10.1373/clinchem.2013.206359</u> PMID: <u>23938455</u>.
- Wang Q, Yang X, He Y, Ma, Lin, Fu P, et al. Droplet Digital PCR for Absolute Quantification of EML4-ALK Gene Rearrangement in Lung Adenocarcinoma. J Mol Diagn. 2015. Epub 2015/07/06. doi: <u>10.</u> <u>1016/j.jmoldx.2015.04.002</u> PMID: <u>26142544</u>.
- Perez-Toralla K, Pekin D, Bartolo JF, Garlan F, Nizard P, Laurent-Puig P, et al. [Digital PCR compartmentalization I. Single-molecule detection of rare mutations]. Medecine sciences: M/S. 2015; 31(1):84–92. Epub 2015/02/07. doi: <u>10.1051/medsci/20153101017</u> PMID: <u>25658735</u>.
- Caen O, Nizard P, Garrigou S, Perez-Toralla K, Zonta E, Laurent-Puig P, et al. [Digital PCR compartmentalization II. Contribution for the quantitative detection of circulating tumor DNA]. Medecine sciences: M/S. 2015; 31(2):180–6. Epub 2015/03/07. doi: <u>10.1051/medsci/20153102015</u> PMID: <u>25744265</u>.
- Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. Clinical chemistry. 2015; 61(1):112–23. Epub 2014/11/13. doi: <u>10.1373/clinchem.2014.222679</u> PMID: <u>25388429</u>.

- Francis G, Stein S. Circulating Cell-Free Tumour DNA in the Management of Cancer. Int J Mol Sci. 2015; 16(6):14122–42. Epub 2015/06/24. doi: <u>10.3390/ijms160614122</u> PMID: <u>26101870</u>; PubMed Central PMCID: PMC4490543.
- Tsao SC, Weiss J, Hudson C, Christophi C, Cebon J, Behren A, et al. Monitoring response to therapy in melanoma by quantifying circulating tumour DNA with droplet digital PCR for BRAF and NRAS mutations. Scientific reports. 2015; 5:11198. Epub 2015/06/23. doi: <u>10.1038/srep11198</u> PMID: <u>26095797</u>; PubMed Central PMCID: PMC4476039.
- 15. http://www.who.int.
- Douillard JY, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer. 2014; 9(9):1345–53. Epub 2014/08/15. doi: <u>10.1097/JTO.00000000000263</u> PMID: <u>25122430</u>; PubMed Central PMCID: PMC4224589.
- Nishiyama A, Katakami N, Yoshioka H, Iwasaku M, Korogi Y, Hata A, et al. Retrospective efficacy and safety analyses of erlotinib, pemetrexed, and docetaxel in EGFR-mutation-negative patients with previously treated advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. Lung Cancer. 2015. Epub 2015/07/ 05. doi: <u>10.1016/j.lungcan.2015.06.017</u> PMID: <u>26141215</u>.
- Gainor JF, Shaw AT. Emerging paradigms in the development of resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. J Clin Oncol. 2013; 31(31):3987–96. Epub 2013/10/09. doi: <u>10.1200/JCO.2012.45.2029</u> PMID: 24101047; PubMed Central PMCID: PMC3805932.
- Massarelli E, Johnson FM, Erickson HS, Wistuba II, Papadimitrakopoulou V. Uncommon epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer and their mechanisms of EGFR tyrosine kinase inhibitors sensitivity and resistance. Lung Cancer. 2013; 80(3):235–41. Epub 2013/03/15. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.01.018 PMID: 23485129.
- Yung TK, Chan KC, Mok TS, Tong J, To KF, Lo YM. Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. Clin Cancer Res. 2009; 15(6):2076–84. Epub 2009/03/12. doi: <u>10.1158/1078-0432.CCR-08-2622</u> PMID: <u>19276259</u>.
- 21. http://www.mycancergenome.org.
- Juchum M, Gunther M, Laufer SA. Fighting cancer drug resistance: Opportunities and challenges for mutation-specific EGFR inhibitors. Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2015; 20:12–28. Epub 2015/05/30. doi: <u>10.1016/j.drup.2015.05.002</u> PMID: 26021435.
- Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol. 2008; 26(3):374–9. Epub 2008/01/19. doi: 10.1200/JCO.2007.12.5906 PMID: 18202412.
- Tougeron D, Lecomte T, Pages JC, Villalva C, Collin C, Ferru A, et al. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2013; 24(5):1267–73. Epub 2013/01/08. doi: 10.1093/annonc/mds620 PMID: 23293113.
- Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. Cancer Res. 2006; 66(8):3992–5. Epub 2006/ 04/19. doi: <u>10.1158/0008-5472.CAN-06-0191</u> PMID: <u>16618717</u>.
- Zheng D, Wang R, Zhang Y, Pan Y, Cheng X, Cheng C, et al. The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation subtypes in lung adenocarcinomas from Chinese populations. OncoTargets and therapy. 2016; 9:833–43. Epub 2016/03/10. doi: <u>10.2147/OTT.S96834</u> PMID: <u>26955281</u>; PubMed Central PMCID: PMC4768896.
- Huang J, Lohr JM, Nilsson M, Segersvard R, Matsson H, Verbeke C, et al. Variant Profiling of Candidate Genes in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Clinical chemistry. 2015; 61(11):1408–16. Epub 2015/09/18. doi: <u>10.1373/clinchem.2015.238543</u> PMID: <u>26378065</u>.
- Didelot A, Le Corre D, Luscan A, Cazes A, Pallier K, Emile JF, et al. Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS, BRAF and EGFR mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples. Experimental and molecular pathology. 2012; 92(3):275–80. Epub 2012/03/20. doi: <u>10.1016/j.</u> yexmp.2012.03.001 PMID: 22426079.
- Duffy MJ, Synnott NC, McGowan PM, Crown J, O'Connor D, Gallagher WM. p53 as a target for the treatment of cancer. Cancer treatment reviews. 2014; 40(10):1153–60. Epub 2014/12/03. doi: <u>10.1016/</u> j.ctrv.2014.10.004 PMID: <u>25455730</u>.
- Li J, Yang L, Gaur S, Zhang K, Wu X, Yuan YC, et al. Mutants TP53 p.R273H and p.R273C but not p. R273G enhance cancer cell malignancy. Hum Mutat. 2014; 35(5):575–84. Epub 2014/03/29. doi: <u>10.</u> <u>1002/humu.22528</u> PMID: <u>24677579</u>.

- Zhang Y, Zhang YJ, Zhao HY, Zhai QL, Zhang Y, Shen YF. The impact of R213 mutation on p53-mediated p21 activity. Biochimie. 2014; 99:215–8. Epub 2014/01/05. doi: <u>10.1016/j.biochi.2013.12.017</u> PMID: <u>24384472</u>.
- Zonta E, Nizard P, Taly V. Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research. Advances in clinical chemistry. 2015; 70:197–246. Epub 2015/08/02. doi: <u>10.1016/bs.acc.2015.03.002</u> PMID: <u>26231488</u>.
- Milbury CA. Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. Biomolecular Detection and Quantification. 2014;Volume 1(Issue 1):Pages 8–22.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. Clinical chemistry. 2013; 59(1):110–8. Epub 2012/09/28. doi: 10.1373/clinchem.2012.194258 PMID: 23014601.
- Zheng D, Ye X, Zhang MZ, Sun Y, Wang JY, Ni J, et al. Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. Scientific reports. 2016; 6:20913. Epub 2016/02/13. doi: <u>10.1038/srep20913</u> PMID: <u>26867973</u>; PubMed Central PMCID: PMC4751431.
- Yang X, Zhuo M, Ye X, Bai H, Wang Z, Sun Y, et al. Quantification of mutant alleles in circulating tumor DNA can predict survival in lung cancer. Oncotarget. 2016. Epub 2016/03/19. doi: <u>10.18632/</u> <u>oncotarget.8021</u> PMID: <u>26989078</u>.
- 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; 6 (224):224ra24. Epub 2014/02/21. doi: <u>10.1126/scitranslmed.3007094</u> PMID: <u>24553385</u>; PubMed Central PMCID: PMC4017867.
- Zhong Q, Bhattacharya S, Kotsopoulos S, Olson J, Taly V, Griffiths AD, et al. Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. Lab Chip. 2011; 11(13):2167–74. Epub 2011/05/18. doi: <u>10.1039/c1lc20126c</u> PMID: <u>21584334</u>.

A.I.3. DISCUSSION DE LA PARTIE A.I.

La PCR digitale en gouttelettes, combinée aux sondes de détection par fluorescence permet de développer des tests hautement sensibles, précis et quantitatifs. La mise au point et l'optimisation de tests en PCR digitale sont requises en dépit d'une première validation par le fournisseur. En effet, bien que certains tests soient valides en qPCR, ils s'avèrent parfois non efficaces lors d'un essai en dPCR (ne permettent pas d'atteindre une forte sensibilité). Le premier élément à vérifier est la spécificité de la détection de la cible, avec l'utilisation de contrôles positifs et négatifs. Il est aussi requis d'évaluer la limite de blanc (estimation du nombre de faux positifs). Celle-ci peut être déterminée grâce à l'utilisation d'ADN génomique normal ou encore, par le recours aux échantillons de sujets sains. Ainsi, le test est effectué en « conditions réelles », et le résultat permet de déterminer un bruit biologique potentiel des échantillons cliniques selon l'altération observée. La limite de détection (LOD) est dépendante de la limite de blanc (LOB), comme décrit dans Milbury *et al.*²⁵⁹. Afin de pouvoir détecter de façon précise et sensible de l'ADN muté, il est également nécessaire de procéder à des tests de dilutions en série, qui permettent d'évaluer la reproductibilité, la linéarité du test et la sensibilité analytique de l'essai.

Systèmes de détection par émission de fluorescence : sondes d'hydrolyse

Il existe divers types de systèmes de détection basés sur l'émission de fluorescence. Au cours de cette première partie, des projets se sont focalisés sur l'utilisation de sondes TaqMan® ou CAST®. La technologie TaqMan® correspond à un système comprenant un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence, appelé « quencher », sur une sonde d'hydrolyse spécifique de la mutation. Avec le système CAST®, l'amorce est spécifique de la mutation, et la rupture de la sonde permet l'émission de fluorescence lors de l'élongation par la polymérase. Des séquences « Minor Groove Binding » (MGB), sont ajoutées aux sondes TaqMan® et CAST[™]. Ils correspondent à des tri-peptides se liant aux séquences riches en acides nucléiques AT, permettant d'augmenter les interactions entre la séquence cible et la sonde. Cela stabilise la séquence d'ADN et augmente la sensibilité du test. Une autre optimisation consiste en l'ajout d'un second quencher, il s'agit du système des sondes ZEN[™], qui permet de diminuer le bruit de fond en fluorescence et ainsi atteindre une meilleure sensibilité que les sondes TaqMan® basiques²⁵⁹.

Afin de déterminer quel mode de détection est le plus adapté à la quantification de séquences rares d'ADN circulant, le premier projet s'est axé sur la comparaison des sondes CAST® et TaqMan®. En outre, un intérêt de la PCR digitale en gouttelettes est la capacité de multiplexer les cibles et ainsi optimiser le coût et le débit d'analyse. Avant de pouvoir mettre au point un test multiplex ciblant plus de 2 altérations, il faut évaluer le test en duplex puis comparer la sensibilité et la spécificité du multiplex, tel que mentionné dans les recommandations MIQE de Huggett *et al.*³⁰⁹ et dans les travaux de Taly *et al.*^{252,288}. Il est difficile de conclure quant à quel test utiliser en PCR digitale, d'autant que l'utilisation de combinaison de sondes avec des chimies différentes en un test multiplex s'est avérée possible et pertinente pour la détection d'altérations clefs dans le cancer du poumon (article, souschapitre **A.I.2**).

Optimisation des sondes de détection et applications en dPCR

Il existe d'autres types de sondes augmentant la sensibilité et la spécificité des tests par diverses caractéristiques. La technologie Scorpion par exemple, qui présente une structure en épingle à cheveux, offre divers avantages. Les amorces et sondes sont combinées, couplant ainsi l'hybridation et la détection, tout en limitant le coût.

La structure en épingle à cheveux permet de diminuer le niveau de fluorescence en absence de molécule cible, augmentant ainsi la sensibilité. Ce système a été utilisé pour la détection de mutations rares dans des échantillons de tumeurs du poumon avec le système BioMark[™] et le Digital PCR Analysis Software (Fluidigm[™])³¹⁰. Le système ARMS (Amplification Refractory Mutation System), correspondant à la technologie CAST[™], a démontré de fortes sensibilités en dPCR en atteingnant 0.1% de détection en comparaison à 1% en qPCR³¹¹.

L'ajout de peptides analogues d'acides nucléiques, tels que les PNA (peptids nucleic acids) permet une incrémentation des systèmes de détection évoqués ci-dessus, notamment dans le cas de sondes de détection TaqMan®. En utilisant la PCR digitale couplée au système PNA, Ichiyama *et al.* ont pu quantifier l'ADN muté du gène *GNAQ* dans la salive ou le sang de patients atteints de syndrome Sturge-Werber avec une sensibilité de détection de 0.1%³¹². Les auteurs avaient pu détecter cette altération avec une sensibilité de 1% en NGS et 0.25% en ddPCR[™] non couplée aux sondes PNA.

Une autre application, utilisant le système RainDrop (RainDance Technologies[™]) combiné aux sondes ZEN[™] de la société IDT auxquelles des LNA (locked nucleic acids) ont été ajoutés³¹³. Ces séquences augmentent la température d'hybridation de la sonde, elles permettent une meilleure hybridation de la sonde à la séquence cible optimisant ainsi la spécificité de détection.

Un autre type de détection reposant sur les intercalants ou colorants se liant à l'ADN, est attractif, notamment pour le multiplexage. Combiner ce système aux sondes de détection décrites pourrait permettre de développer des tests basés sur la quantification de fragments portant une même altération mais de tailles différentes. McDermott *et al.* ont utilisé ce système, ainsi que Lee *et al.* afin de détecter des cibles différentes. Le travail de McDermott *et al.* montrait la possibilité de coupler l'intercalant EvaGreen® à l'utilisation d'une sonde TaqMan®, afin de détecter 3 cibles avec le système ddPCR[™] en faisant varier la taille de la cible ou la concentration en amorces. Cependant, avec l'EvaGreen® seul, les auteurs ont développé un test ciblant 2 cibles différentes seulement. Au cours du projet de thèse, nous avons tenté de développer un test de détection de 4 tailles d'amplicon différentes sur un même gène utilisant l'EvaGreen®. Ce test avait pour but, *in fine*, de quantifier le nombre de fragments circulants selon leur taille (voir la partie sur l'intégrité de l'ADNtc, **A.II.**). Cependant il n'a pas été possible de développer un test qui permette de différencier précisément les populations cibles (données non montrées).

Dans cette partie, nous avons montré que la combinaison de la PCR digitale aux technologies de détection profitant de l'optimisation de la physico-chimie de ces systèmes ouvre la voie à des tests de plus en plus précis, sensibles et spécifiques.

CHAPITRE A.II. ETUDE DE L'INTEGRITE DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT - PREAMBULE

L'intégrité de l'ADN circulant a été étudiée dans de nombreuses études dans le but de déterminer son potentiel comme marqueur spécifique du cancer. Ce marqueur présenterait l'avantage de s'affranchir de la détermination du statut mutationnel.

Les études précédentes ont mis en place la détermination d'un Index d'Intégrité de l'ADN (DII) comme mesure d'évaluation de la fragmentation. Les résultats étaient très discordants entre études¹⁹³. En effet, certains travaux décrivaient parfois une intégrité élevée de l'ADN circulant chez des patients atteints de cancer en comparaison à des sujets sains, tandis que d'autres études suggéraient que l'ADN circulant était plus fragmenté chez les patients^{172,191,314,315} (voir Introduction, partie II.ii.).

Ces différences ont été attribuées, dans certaines études, au processus de mort cellulaire qui donnerait lieu à une fragmentation variable : l'ADN libéré par une cellule apoptotique serait assez court (150-200pb), et l'ADN provenant de cellules nécrotiques serait sous la forme de longs fragments^{130,316,317}.

Dans le même temps, les techniques de PCR ont évolué et de nouvelles approches ont émergé, comme le séquençage, la PCR digitale, ou encore la technique IntPlex³¹⁸. Elles ont permis une meilleure caractérisation de l'ADNtc^{132,200}. Certaines approches reposent sur la quantification des fragments mutés et l'évaluation de leur taille afin de caractériser spécifiquement l'ADNtc. Il a été suggéré que l'ADNtc aurait un profil de distribution en taille correspondant à une libération de fragments par apoptose (taille de nucléosomes (166-180pb) et de multiples de nucléosomes).

Dans ce contexte, nous voulions mettre en place un test bénéficiant de la sensibilité et de la précision de la PCR digitale en gouttelettes qui permette de déterminer de façon fiable le DII de l'ADNtc. Nous nous sommes intéressés à la fragmentation de l'ADNtc de patients en comparaison à celle de l'ADN circulant chez des sujets sains, afin d'évaluer l'intégrité de l'ADN circulant comme marqueur du cancer ; puis nous avons étudié le lien entre le processus de mort cellulaire et la fragmentation de l'ADN circulant, sujet à controverse ; et enfin, nous avons évalué l'intégrité de l'ADN circulant une nouvelle approche de profilage de l'ADN.

Ces aspects sont présentés sous forme des trois sous-chapitres suivants, qui portent sur :

- le développement d'une stratégie en PCR digitale en gouttelettes pour la détermination de la fragmentation de l'ADNtc et l'application à des échantillons clinique; ce travail fera l'objet d'une publication qui est en cours de préparation.
- l'analyse d'échantillons d'origine apoptotique ou nécrotique à l'aide d'un modèle *in vitro* afin de déterminer s'il existe un lien entre le processus de mort cellulaire et la taille des fragments libérés, comme cela avait été suggéré par les études antérieures;
- 3) une nouvelle approche de la détermination du profil de distribution en taille des fragments circulants pour mesurer l'intégrité de l'ADN chez des patients et des sujets sains et comparer les résultats à l'analyse en PCR digitale en gouttelettes. Ces travaux en cours de finalisation devraient donner lieu à une publication.

A.II.1. ARTICLE EN PRÉPARATION

"Characterization of plasma cell free DNA integrity using picoliter-droplet digital PCR"

Characterization of plasma cell free DNA integrity using picoliter-droplet digital PCR: towards the development of a circulating tumor DNA - dedicated assay

<u>Authors</u>: Fanny Garlan¹, Eleonora Zonta¹, Quentin Tavernier¹, Audrey Didelot¹, Nicolas Pecuchet^{1,2}, Elisabeth Fabre^{1,3}, Helene Blons^{1,3}, Aziz Zaanan^{1,2}, Pierre Laurent-Puig^{1,3}, Valérie Taly^{1*}.

Affiliations:

¹Université Sorbonne Paris Cité, INSERM UMR-S1147, CNRS SNC 5014, Équipe labélisée LNCLC, Centre Universitaire des Saints-Pères, Paris, France.

²Medical oncology, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France.

³Biochemistry department - Unit of pharmacogenetic and molecular oncology, Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France.

*Corresponding author e-mail: valerie.taly@parisdescartes.fr.

Key words

Circulating cell-free DNA, circulating tumor DNA, DNA integrity index, pcioliter-droplet digital PCR, apoptosis, necrosis, cancer biomarker.

Abreviations

KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten homolog) rat sarcoma viral oncogene EGFR (epidermal growth factor receptor) bp (base-pairs) nt (nucleotides) ccfDNA (circulating cell free DNA) ctDNA (circulating tumor DNA) dPCR (digital PCR) DII (DNA Integrity Index) qPCR (quantitative PCR) mCRC (metastatic colorectal carcinoma) MT (mutated) NSCLC (non-small cells lung cancer) WT (wild-type)

Abstract

Circulating DNA is being explored as a diagnostic and prognostic tool for various diseases, especially for cancer. Beyond evaluation of DNA mutational status, its fragmentation has been investigated in many studies as a potential cancer biomarker. However, contradictory results have been described. Herein we designed TaqMan® size-dedicated assays using primers pairs amplifying fragments of different lengths to target frequent mutations on *KRAS* (p.G13D, p.G12V) and *EGFR* (p.L858R) genes. These assays were validated on fragmented and non-fragmented DNA from human cancer cell lines. Circulating tumor DNA (ctDNA) concentrations and DNA integrity Index (DII) were determined from plasma samples of metastatic colorectal cancer (mCRC) and non-small cells lung cancer (NSCLC) patients. Our results demonstrate that ctDNA is highly fragmented, suggesting the need for tailored assays for its accurate quantification. Moreover, low concentration samples could be efficiently operated when using digital PCR-based assays dedicated to ctDNA quantification. DII obtained from patients were compared to DII from plasma of healthy subjects. A significant difference of circulating DNA integrity between cancer patients and healthy subjects was observed. Such results demonstrate the advantage of tailored assays rendering possible the analysis of complex samples.

Introduction

Following numerous studies, it is now commonly assumed that circulating cell-free DNA (ccfDNA) floats in body effluents (such as blood, urine, cerebrospinal and pleural fluids, and even stool). High amounts of ccfDNA can be found in blood samples of patients affected by several disorders including cancer (). In particular, depending on genetic events that cells underwent, it has been shown that disease-related death lead to specific forms of circulating nucleic acids. Many studies have focused on analysis of the mutational status of ccfDNA (6-8), which has been suggested as reflecting tumor burden and progression. Besides, it has been shown that DNA integrity (defined as a metric describing the size distribution and the quality of DNA) can be used as a potential non-invasive diagnostic biomarker for various physiological and pathological states (9), especially for cancer (10-15). Indeed, it has been suggested that DNA deriving from tumor cells (circulating tumor DNA, ctDNA) shows a different particular fragmentation profile as compared to the one originating from non-tumor ones (9). To evaluate the potential of DNA integrity for its application as a universal tool for diagnosis and monitoring, a better understanding of the structure of ccfDNA and of its release mechanisms is required.

Quantitative PCR (qPCR) is the most common method for DNA integrity determination (16, 17). DNA integrity is generally assessed by measuring the relative amount of different DNA amplicons' sizes. A "DNA Integrity Index" (DII) is then calculated as the ratio of long over short fragments (or the opposite ratio according to authors definition, even if less frequent (18)). The main source of ccfDNA in healthy individuals, except in cases of inflammation or effort, is apoptotic cells (multiple of 180-200 base-pairs (bp) fragments). Tumor cells are expected to undergo a passive and unregulated form of cell death, suggested as releasing long DNA fragments. Such fragments have been proposed as characterising tumor-derived DNA (19). Because the annealing sites of the short amplicon are within the longest one, the short fragment could amplify both shorter (deriving from apoptosis) and longer fragments, thus short-qPCR results represent the total amount of ccfDNA, while long amplicon results represent the amount of DNA released from non-apoptotic cells and thus, can be used as a necrotic cell death marker.

Despite the consequent amount of reported results, there are still inconsistencies between studies. Umetani and colleagues observed by qPCR a higher ratio of long over short fragments (after measuring the amount of two amplicons of ALU repeated DNA sequences, ALU 247/ALU 115 bp, where ALU represent noncoding repetitive DNA elements) in serum of colon cancer patients (14) and breast cancer patients (20) than in controls, suggesting that DNA was longer in cancer cases than in healthy individuals. Later on, Moulière *et al.* described an optimized qPCR technique, called IntPlex, which consists on targeting mutant fragments of small sizes whilst blocking the wild-type sequence, to calculate the DII (13). The authors applied their technique on a cohort of colon cancer patients and reported a larger amount of small fragments than longer ones in plasma of colorectal cancer patients compared to healthy subjects (13). Bypassing qPCR technical limitations, Jiang *et al.* proposed a novel approach based on massive parallel sequencing, and evidenced a particular size distribution profile in free DNA in hepatocellular carcinoma (21). They reported a majority of highly fragmented

DNA (around 166 bp, nucleosomic complex) in plasma of patients having high fraction of tumor DNA, while patients with low ctDNA amount in plasma could be discriminated by a dominant percentage of longer fragments. Recently, Underhill *et al.* have identified a shift in the fragment length of ctDNA in melanoma patients and lung cancer patients as compared to healthy controls³¹⁹. Interestingly, the authors have shown that size-selecting of shorter cell-free DNA fragment lengths substantially increased the EGFR T790Mmutant allele frequency in human lung cancer.

In summary, depending on the applied method, different results were reported, often presenting contradictory evidences although the latest findings tend to demonstrate a high fragmentation of ctDNA. For this reason there is a growing need for harmonizing techniques dedicated to circulating DNA analysis allowing a better characterization of this potential biomarker. Moreover, a better understanding of ctDNA distribution profiles would help to design efficient PCR assays.

The aim of the present study was to improve the capacities of ccfDNA analysis using a truly sensitive and quantitative tool in order to interrogate with high precision the integrity of ccfDNA as a cancer marker. To do so, we optimized a picoliter droplet based digital PCR assay for size characterization and mutational status analysis of the v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*) and epidermal growth factor receptor (*EGFR*) genes, often misregulated in colorectal and lung cancers. For both genes we designed dedicated size assays targeting common mutations (*KRAS* p.G13D and p.G12V and *EGFR* p.L858R) to quantify sequences of different sizes, measure the DII in patients and healthy individuals and determine the concentrations of wild-type and mutated alleles as well as the mutation percentage.

Materials and Methods

Cell lines and growth conditions.

Colorectal cancer cell lines SW620 (*KRAS*-mutated, c.35G>T, p.G12V), LoVo (*KRAS*-mutated, c.38G>A, p.G13D), and lung cancer cell line H1975 (*EGFR*-mutated, c.2369C>T, p.T790M and c.2573T>G, p.L858R) were purchased from ATCC (Manassas, VA 20110, US) and cultured in L-15 medium for SW620 cell line (Thermo Fisher Scientific, Saint Aubin, France), F-12 medium (Thermo Fisher Scientific) for LoVo cell line and RPMI-1640 medium for H1975 cell line, supplemented with 10% fetal bovine serum (Dominique Dutscher) and 1% Sodium Pyruvate and Hepes (Thermo Fisher Scientific). Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂.

Human plasma samples.

Plasma samples were collected before chemotherapy (N=12 mCRC, N=5 NSCLC) or during first line treatment (N=8 NSCLC) from cohorts of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) and lung cancer patients (NSCLC, stages IIIB and IV). Whole blood (4 EDTA tubes of 5 mL) was centrifuged at 2,000g at room temperature for 15 minutes. Plasma were stored at -20°C and centrifuged a second time at 2,000g at room temperature for 15 minutes in an Eppendorf 5430R centrifuge before DNA extraction. Colorectal patients bearing KRAS p.G13D (N=9) or KRAS p.G12V (N=3) mutations and

lung cancer patients bearing EGFR p.L858R (N=13) mutations were selected. DNA extracted from the first collected plasma sample (before chemotherapy) or along the follow-up were tested using the size assay. As controls, 47 plasma samples from healthy individuals were used (Analytical Biological Services Inc., Wilmington, United-States and Biological Specialty Corporation, Colmar, US). Selection criteria were defined as non-smoking, not pregnant and without cancer or inflammation disease. For a strict comparison of samples from cancer patients and healthy donors, extraction and analyses were performed in the same conditions.

DNA extraction, fragmentation and quantification.

Cell lines DNA were extracted using the QIAamp® DNA Mini and blood Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and eluted into 200 μ L of Tris 10 mM at pH 8 and stored at -20°C. Cell-free DNA was extracted from plasma samples using QIAmp® Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions, and resuspended into 50 μ L of elution buffer.

DNA from cells supernatants was extracted with the Maxwell® RSC Instrument, using the ccfDNA Plasma kit (Promega) according to the manufacturer's instructions, and resuspended into 60 μ L of elution buffer. All DNA were stored at -20°C. DNA was measured by Qubit® 2.0 Fluorometer (Qubit® dsDNA BR Assay kit for DNA from cell lines and HS Assay kit for plasma and supernatant DNA -Thermo Fisher Scientific).

DNA from LoVo (bearing p.G13D KRAS mutation), SW620 (bearing p.G12V KRAS mutation) and H1975 (bearing p.L858R EGFR mutation) cell lines were fragmented by sonication (S220 Focused-Ultrasonicator sonicator; Covaris, Woburn, MA) to obtain fragments ranging from 50 bp to 700 bp. The size distribution of fragmented DNA was confirmed by the miniaturized electrophoresis Caliper system, LabChip® GX/GXII Microfluidic system (Perkin-Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) using DNA assay 5K reagent kit (Perkin-Elmer, Villebon-sur-Yvette, France).

Primers and probes design for the size test.

Primers design has been performed on the NCBI Primer Designing Tool that allows selection of the best primers' combinations regarding target sequences (optimal GC content, melting temperature). Primers and probes sequences are detailed in Supplemental Figure 1. Assay mix have been prepared with final concentration of 0.8 μ M of primers and 0.4 μ M of TaqMan® probes, as previously described (22).

Circulating DNA quantification by picoliter-droplet digital PCR.

All PCR reactive were prepared as previously described (22). Six µL of cell line DNA or plasma DNA were added to the each assay prior to encapsulation. The samples were thermal-cycled (refer to Supplemental Figure 2 for thermocycling programs) using a BioRad® thermal cycler (MJ-Mini, S1000, or C1000 touch).

Within TaqMan® assay, the probe bearing VIC-fluorophore (λ_{ex} 538 nm / λ_{em} 554 nm) was designed to be specific to the WT allele, while the probe bearing FAM fluorophore (λ_{ex} 494 nm / λ_{em} 518 nm) was able to specifically hybridize to the mutated sequence (p.G13D or p.G12V for KRAS, p.L858R mutation for EGFR).

For all digital PCR experiments, droplets events have been normalized to five millions droplets (the partition number theoretically expected), and the number of mutated-DNA containing droplets has been re-calculated after subtraction of the Limit of Blank, typical of each probe and assay. The LOB were calculated from the analysis of plasma DNA samples of healthy donors: false positive events follow the Poisson law distribution, which permits to calculate the Limit of blank, as described earlier in Zonta *et al.*. The LOB for the 302, 164, 86 and 60 bp *KRAS* assays were respectively 0, 0, 3 and 1. The LOB for the 140, 85 and 60 bp *EGFR* assays were respectively 0, 0, 1.

Data analysis.

Data were analyzed according to manufacturer's instructions (Raindance Analyst Flow-Jo software). Since the number of counts per cluster reveals the quantity of amplifiable target DNA, the fraction of amplifiable DNA in patients' samples could be determined. Assuming that the mass of a haploid genome equivalent is 3.3 pg, the number of genomes equivalents in a sample and the plasmatic concentration can be calculated. Starting from the same amount of DNA, amplified fragmented copies of long and short fragments were counted to calculate the DNA Integrity Index. In order to determine the DII, ratios long (140bp for *EGFR* / 302bp for *KRAS*) over short fragments (60pb) were counted starting from the same amount of DNA. Statistical analysis were performed on Excel and Prism software (GraphPad Software, Inc.).

Results

Development of a validation test on cell line DNA: fragmented DNA as a model for plasmatic DNA analysis.

In the last years, disparate works reported plasmatic DNA as highly fragmented, with a distribution of varying sizes (13, 14, 21). However, there is still a lack of agreement for assessing plasma DNA fragmentation, especially in regard to the method to apply for its analysis.

The first step of the study was to set up a model proper to the evaluation of the method of DNA integrity assessment. To do so, a test was designed to target one same mutation using different sizes of amplicon. On two different colorectal cancer cell lines (SW620 and LOVO), *KRAS* p.G13D (c.38G>A) and p.G12V (c.35G>T) (mutations were targeted with TaqMan® probes, and primers allowing the amplification of 60, 86, 164 and 302 bp sequences (Figure 1A). On the *EGFR* mutated cell line (H1975, p.L858R, c.2573T>G), amplicons of three different sizes were produced 60, 85 and 160 bp and a TaqMan® probe allowed to detect the mutation (Figure 1B). These tests were developed in picoliter-droplet digital PCR, as shown in **Figure 1**.



Figure 1. Design of the picoliter-droplet digital PCR assays developed to target different amplicons' sizes detecting the mutation on (A) KRAS p.G13D DNA from LOVO cell line; KRAS p.G12V from SW620 cell line, or (B) EGFR p.L858R DNA from H1975 cell line.

The tests were validated on sonication-fragmented DNA from the LOVO (KRAS p.G13D), SW620 (KRAS p.G12V) and H1975 (EGFR p.L858R) cell lines. Lengths of fragments, as evaluated using the Caliper Lab Chip (see Material and methods), varied between 50-70 bp and 700-800 bp with increasing amounts of higher size fragments (see Supplementary Figure 3). Non-fragmented DNA allowed to control that all amplicons (independently of their size) were amplified with equal efficiency between wild-type (WT) and mutant (MT) amplicons, leading to a DII of 1. This non fragmented (NF) DNA testing is also a positive control of the mutation load. From this basis, the percentage of mutation (as compared to total DNA) in non-fragmented and fragmented DNA were compared and are similar



for the three tested cell lines (Figure 2, panel A, resp. NF and F). The DII was calculated in both cases. It remained stable in non-fragmented DNA and varied in fragmented DNA (Figure 2, panel B,

Figure 2. Representation of the percentage of mutant DNA (A) and Degree of Integrity Index (DII) (B) obtained for fragmented (F) and non-fragmented (NF) DNA from LOVO, SW620 and H1975 cell lines, which respectively bear the KRAS p.G13D, KRAS p.G12V and EGFR p.L858R mutations. (A) Mutant percentages were determined in fragmented and non-fragmented DNA from cell lines. This percentage remains stable independently of the DNA fragments length (NF or F). (B) The DII does not vary in the case of non-fragmented DNA. The sample contains mostly long fragments and thus all fragments are equally amplified independently of the primers couple. On the opposite, with fragmented DNA, DII values increase when amplicons' length increases (in the following order: 302/60, 302/86, 302/164) for mutant and wild-type. For means and standard deviation values, see tables 1 (%MT) and 2 (DII).

Non-fragmented (NF) DNA contains mainly long fragments thus leading to a stable DII. On the opposite, fragmented DNA samples contain different amplicon sizes. Since a majority of fragments present sizes below 302 bp in fragmented DNA, 60 bp primers pair allows their amplification. Amplicons of 86 bp, 164 bp and 302 bp are gradually less amplified in this order. This profile of amplification is represented by the DII values: from 60 to 164 bp amplicons sizes, the DII increases as the number of short fragments decreases. In the meantime, the percentage of MT DNA remains stable in both fragmented and non-fragmented cases. These results assess the validity of the test as being both size- and tumor specific besides being quantitative.

Clinical samples analysis: ctDNA concentration and percentage of mutation depend on the size of amplicons.

Using picoliter droplet digital PCR in duplex format (as shown in Figure 1), WT and MT DNA alleles can be precisely quantified, which allows to precisely evaluate both mutated and non mutated DNA concentrations. Samples were tested with the different size assays according to the mutation detected

in patients' tumors. Different values were observed depending on the primers pair that was used (Figure 3, panels A1 and A2, %MT). Smaller amplicons lead to higher ctDNA concentrations and higher mutation percentage in comparison to longer ones, suggesting that ctDNA is structured as short fragments.

In mCRC patients (Figure 3, panel A1), a sharp increase of ctDNA concentration is observed from amplicons 302 bp to 86 bp. A small difference is also noticeable between ctDNA concentrations when using amplicons of 86 and 60 bp in most patients. For three patients (references P14, P26, P32), no MT DNA could be detected with the primers pair amplifying 302 bp sequences, which is consistent with the fact that short amplicons are more suited to ctDNA detection. Concentrations of ctDNA are significantly different between paired values of 302bp and 60bp in colorectal cancer patients (non-parametric paired t test, Wilcoxon, p=0.004, data not shown). Similar variations of the percentage of mutation are observed (Figure 3, panel B1), which increases as the length of the amplified sequence decreases.



Figure 3. Concentration of plasma ctDNA (A) and percentage of mutation (B) obtained in clinical samples (mCRC, A1 and B1; NSCLC, EGFR, A2 and B2). See tables 5 and 6 for concentrations and mutations' percentages. (A) The ctDNA amount is higher or close with the assays targeting short sequences (60 and 86 bp versus 164 and 302 bp (A1, KRAS assay); 60 and 85 bp versus 140 bp (A2, EGFR)). (B) Percentages of mutation (%MT) increase when the amplicon's size decreases.

In NSCLC (Figure 3, panel A2 and B2), similar variations are observed: ctDNA concentrations (A2) and mutation percentage (B2) increase as the amplicon's size decreases. In most cases, the amount of amplicons of 60 bp and 86 bp are very close. In five cases, no MT DNA was measured

independently of the primers pair (data not shown). Concentration of ctDNA are significantly different between paired values of 140 bp and 60 bp in NSCLC patients (non-parametric paired t test, Wilcoxon, p=0.02, data not shown). Primers sets amplifying short sequences are tailored to ctDNA detection since rendering detectable more circulating fragments, meaning that MT DNA are mostly short sized.

Dll evaluation: a direct tool to relate ctDNA concentration to the fragmentation profile.

As observed, measured plasmatic ctDNA concentrations and mutation percentages are influenced by the size of target sequences specific to cancer. Determining the DII permits to discriminate samples according to their fragmentation herein drawing a distribution pattern of size. Results presented in Figure 4 indicate that DII increases as the size of amplicons increases for cancer patients' samples, meaning that a higher fragmentation is observed when looking at MT DNA alleles.

More precisely, in mCRC patients the difference in amplified DNA between 302 bp and other MT fragments was very high, as shown previously in with very few 302pb fragments detected and high concentrations of 60pb ones (Figure 4, A1, A2). Consequently, DII are close to zero with very few difference between ratios. Moreover, there is a significant difference between DII values when comparing ratios (Kruskal Wallis test p<0.0001). In NSCLC (Figure 4 panel B), despite no difference between all 4 ratios (Kruskal Wallis test p=0.17), MT DII values for ratio 140/85 (mean 0.57 \pm 0.35) are significantly higher than ratio 140/60 (mean 0.49 \pm 0.26) (Wilcoxon test, p=0.0078).

Many reports describe varying results of DII among cancer types. However, techniques and methodologies used to conduct such study differentiate. In this study, we compared DII between WT and MT DNA in two cancer types using a unique workflow of experiment and analysis. Samples of 12 mCRC and 13 NSCLC patients (Figure 3, panel B1 and B2, respectively and Figure 4) were tested. On Figure 4, the DII for MT and WT DNA are presented for mCRC (panels A1 A2) and NSCLC (panel B) patients.

First, DII values were different when comparing WT and MT DNA. Despite results showing a fragmentation of both MT and WT fragments (DII<1), slightly different profiles of fragmentation emerge. Indeed, in mCRC patients, DII values using ratios 302/164, 302/86 and 302/60 are shown for MT DNA and WT DNA (panel A1). These DII values are close to zero whereas DII for WT DII are more scattered showing that WT DNA is significantly less fragmented (Mann Whitney t test p=0.0033, figure 4 panel A1).

When comparing ratios 164/86 and 164/60, a different observation is made: values are not statistically different between the four groups and there is no significant difference between MT DII ratios nor WT DII ratios (figure 4 panel A2). This result demonstrates the role of size-specific assay on the determination on fragmentation.

In mNSCLC patients, values differ with higher mean MT DII values are more scattered (MT 140/60:0.49± 0.26; 140/85:0.57±0.35) than WT DII values (WT 140/60:0.61±0.10; 140/85:0.68±0.11). However, there is no significant difference between WT and MT DII values nor between MT and DII WT DII ratios.



DII ratio

Figure 4. Comparison of DII for mutated (MT) and wild-type (WT) DNA fragments in (A1 and A2) mCRC patients and (B) NSCLC patients. Means and SD are presented for all measured DII ratios in mCRC and mNSCLC patients. In mCRC, MT DII ratios are all close to zero in panel A1 whereas WT DII are more scattered as shown by means and SD values (Table 3). DII MT and WT are significantly different in mCRC panel A1 (Mann-Whitney). In panel A2, DII corresponding to ratios 164/86 and 164/60 are shown to provide an appropriate comparison to NSCLC DII regarding the size of the largest amplicon. In panel C, concerning NSCLC patients, values differ and the opposite situation is observed: MT DII values are more scattered than WT DII values (for DII values and Means±SD, see Tables 3 and 4). No significant difference are observed between DII in B and C.

To go further, and estimate the implication of a short-sized assay to detect ctDNA, we evaluated the impact on quantification in low concentration samples. Samples where no DNA or concentration of MT

DNA could be detectable (Supplemental Figure 4, Cmt, ng/mL, panel A) with the 86 bp assay were tested using the 60 bp assay for the determination of mutation load (panel C) and both MT and WT concentrations (panels A and B). With the latter, fragments could be amplified thus showing that a test targeting shorter fragments would be relevant to specifically quantify tumor DNA and even total DNA.

These results confirm what was observed with the measurement of ctDNA concentration, MT DNA fragments are short sized that are more likely amplified with short amplicons and thus more accurately quantified. DII results corroborate previously reported data (13) which describe the same tendency and confirms the high fragmentation of tumor DNA. Such observation encourage the development of tests specifically designed for ctDNA detection and bring information regarding anterior studies.

Comparison between circulating DNA from cancer patients and healthy individuals: ccfDNA integrity of healthy subjects is preserved in comparison to cancer patients.

Plasma samples from healthy donors (N=14) were tested by both KRAS G13D and EGFR p.L858R size-assays. 21 and 12 additional samples were respectively tested using either KRAS or EGFR assays (for at least two of each developed assays, summary of the results in Tables 7 and 8).

In Figure 5 the DII observed for both *KRAS* and *EGFR* assays are shown in panels A and B respectively. The mean DII values decrease as the length of the short amplicon decreases. This is consistent with previous testing of ccfDNA that is overall highly fragmented despite not coming from the tumor (since circulating DNA in exclusively WT in healthy subjects).

When comparing with cancer patients (Figure 5, panels A1 and B1), the integrity of circulating DNA in healthy subjects is preserved. In NSCLC, there is a significant difference between MT, WT and Healthy groups (Kruskal-Wallis, p=0.014). MT DII in NSCLC patients and DII in healthy subjects (MT 140/60 and H DII, panel B1) are significantly different (Mann Whitney t test, P=0.016, means±SD are MT 140/60: 0.49±0.26 and H 140/60: 0.67±0.09). In mCRC patients, the difference between mCRC MT DII, WT DII and healthy DII (Kruskall Wallis, p<0.0001). When comparing MT DII and H DII, is even more remarkable (Mann Whitney, p<0.0001).

Concerning WT DII in mCRC or NSCLC compared to DII in healthy subjects, they are significantly different (Mann Whitney t test, p=0.0025 or 0.0319, respectively). Since EGFR-based assays detect 140 bp fragments for the longest amplicons, it appears consistent to observe moderated significance in regard to KRAS-based assays. Such consideration highlights the importance of a fitted assay to compare DNA integrity in healthy and cancer individuals, and being able to properly evaluate its potential as a cancer marker.



Figure 5. DNA Integrity Index (DII) calculated from plasmatic DNA analysis of healthy donors using the KRAS size assays (A) or EGFR L858R size assays (B). The DII values increase with the length of amplicons. In (A), DII(302/164)>DII(302/86)>DII(302/60) [DII(302/164): mean 0,3505 +/- 0,1556; DII(302/86):0,3075 +/- 0,2227 ; DII(302/60): 0,224 +/- 0,164) and in (B), DII(140/85)>DII(140/85); DII(140/85):0,7017 +/- 0,07582; DII(140/60):0,6728 +/- 0,08702. Panel A1 and B2 show the DII for mutated, wild-type circulating DNA in cancer patients (respective mCRC and NSCLC) and the DII of wild-type DNA in healthy individuals (H). For DII values and corresponding means±SD, see Tables 7 and 8.

Conclusion and discussion

In conclusion, the design of specific assays using picoliter-droplet dPCR dedicated to the detection of both MT and WT circulating free DNA allowed to show that targeting short sequences is highly accurate and tailored to ctDNA quantification. The comparison to samples collected from healthy individuals demonstrate a significant difference of fragmentation between tumor DNA and normal DNA.

Over the last decade, enriching results were shown on cell free DNA integrity in different cancer types. They however mainly rely on the ratio of repetition sequences (ALU, LINE1) that are not specific to cancer (14). The detection of plasmatic MT nucleic acids, released by the tumor itself, is essential to evaluate cancer-related DNA integrity in patients. Recently, some tests were optimized in quantitative real time PCR in order to detect MT fragments (15). Moulière *et al.* also innovated with a real time PCR-based assay called Intplex (24). The latter specifically amplifies mutant DNA whilst blocking the amplification of normal DNA, herein allowing an improvement of the sensitivity. These studies are nevertheless limited by the sensitivity of basic bulk PCR techniques that do not reach the detection limit that ctDNA quantification requires.

Emerging methods based on digital PCR allow to design highly precise assays that bring a sensitivity as low as 1/200 000 mutant detection over WT (25). In combination with such sensitivity issues, the size of amplicons in previous studies were mostly restricted to lengths above 100bp, although results (23) demonstrate the high fragmentation, even of cell free DNA in healthy individuals.

Our study shows that the quantification is strongly impacted by the design of the assay. To precisely detect and quantify ctDNA, it is necessary to adapt assays to both the fact that cell free DNA is highly fragmented in general and that each sequence might present specificities, especially when targeting cancer-related genes. Indeed, short amplicons allow a more precise quantification in most cases, and appear particularly relevant in low concentrated samples (see Figure 4 Sup. Inf.). In the experiments represented in this figure, the percentage of mutation remains the same in the P71 case, and is increased in P18 and P63. For the other patients, the ratio mutant over wild-type is about zero (no ctDNA). Comparing both assays allows to validate what was found in using the 86bp design.

Considering gene-specificity aspects, developing new assays on *EGFR* appeared very challenging especially for the production of long amplicons (300 bp). Sequences of this gene contain unstable regions that might prevent from the amplification. Errors generated during the polymerase-chain reaction lead to multiple amplicons (as observed in Caliper Lab Chip and gel electrophoresis verifications, data not shown). To go toward the development of clinically actionable tools, a multiplex format allowing the detection of all sizes in one analysis would be required.

More than the integrity of ctDNA by itself, the study of total circulating DNA in healthy individuals is required to first determine the landscape of cell free DNA size. Some results from literature were performed on cancer patients' samples without parallel testing of samples from healthy individuals. The DNA integrity index values that were described consequently could not be compared to fragmentation that is inherent to normal cells releasing process. In our study, DNA fragmentation in plasma is high both in healthy and cancer individuals, with a significant difference between individuals when comparing 300/60 DII ratios. However, our study is limitated by the number of patients. To

demonstrate a tumor-specific fragmentation, large studies enrolling a large number of cancer patients would be of interest, and to compare results to analysis of ccfDNA in healthy individuals.

The size-assay allows to quantify both MT and WT fragments. MT fragments originate from the tumor site(s), whilst WT fragments may come from the tumor site(s) too, the tumor microenvironment (non-tumor tissues surrounding the tumor) and the other cells ongoing death process. Variable conclusions might be drawn from one sample to another. In a few patients with high ctDNA concentrations at first collection time (before treatment), measurements obtained by testing all assays were equal or very close. A possible conclusion from these results is that the total detectable cell free DNA originates from the tumor and is more fragmented than in other patients. In the opposite, for a patient's sample, only few WT DNA alleles (81 with 60bp assay and 0 with 302bp assay) and no MT alleles were detectable leading to a ctDNA concentration of zero and rendering impossible the calculation of the DII. In similar samples, there are few or no mutated fragments, probably showing that WT DNA came mainly from normal cells.

Our study demonstrates that mutated DNA, released by the tumor, is more fragmented than wild-type DNA, and more generally, than circulating DNA from healthy subjects. However, the limited number of patients requires further investigations. One other limitation is the comparison of samples collected before and after treatment initiation for the DII evaluation. In NSCLC, 8 patients had a started a line 1 treatment, and in other NSCLC patients, samples were collected before the first chemotherapy cycle (N=5 patients). However, no significant difference on DII was observed when comparing the time of sampling (see Supplemental Figure 5). Since patients underwent different treatments, both in CRC or NSCLC pathologies, one might hypothesize that molecules interfere differently with tumor cells as well as non-tumor cells, leading to variable death induction's processes. Such consideration brings about the formulation of trials wherein the use of potential DNA damaging drugs should be better envisaged if aiming at evaluating DNA integrity as a potential cancer marker.

There are many parameters that should be taken into account in further studies, to define the best conditions of the analysis of ctDNA fragmentation. There is a major need of homogeneous guidelines to detect ctDNA with high accuracy and take full advantage of its potential informative value.
Tables

	%MT									
	NFL	٥Vo	F LaVo							
	Mean	SD	Mean	SD						
302bp	67	0 68.07		1.06						
164bp	67.33	0.58	68.48	3.84						
86bp	67	0	67.15	0.42						
60bp	66.67	0.58	66.92 0.20							
	NF S	W620	F SW620							
	Mean	SD	Mean	SD						
302bp	100	0	100	0						
164bp	100	0	100	0						
86bp	100	0	100	0						
60bp	100	۵	100	۵						
	NFH	1975	FH'	1975						
	Mean	SD	Mean	SD						
140bp	74	0.82	74.00	0.82						
85bp	74	0.71	74.00	0.71						
60bp	73.86	0.38	73.86	0.38						

Table 1. Means and SD of percentages of mutation obtained for fragmented and non-fragmented DNA from cell lines.

DI									
	NFL	oVo	FLa	oVo					
	Mean	SD	Mean	SD					
MT 302/164	1.11	0.19	0.46	0.05					
MT 302/86	1.08	0.18	0.35	0.02					
MT 302/60	1.02	0.10	0.32	0.02					
WT 302/164	1.13	0.17	0.49	0.07					
WT 302/86	1.08	0.16	0.33	0.02					
WT 302/60	1.01	0.10 0.31		0.02					
	NF S\	₩ 620	F SW620						
	Mean	SD	Mean	SD					
MT 302/164	0.830	0.090	0.489	0.070					
MT 302/86	0.863	0.045	0.330	0.062					
MT 302/60	0.934	0.040	0.317	0.063					
WT 302/164	0.961	0.132	0.453	0.068					
WT 302/86	0.970	0.165	0.305	0.085					
WT 302/60	0.839	0.084	0.279	0.088					
	NF H	1975	F H1	.975					
	Mean	SD	Mean	SD					
MT 140/85	0.97	0.05	0.81	0.05					
MT 140/60	0.98	0.09	0.72	0.02					
WT 140/85	0.96	0.02	0.81	0.05					
WT 140/60	0.96	0.11	0.72	0.03					

Table 2. Means and SD of the DII obtained for fragmented and non-fragmented DNA from cell lines.

Tables 3 (top) and 4 (bottom).

	mCRC patients - KRAS p.G13D or p.G12V assay											
Sample	MT 302/164	NT 302/86	MT 302/80	WT 302/164	WT 302/86	WT 302/80	MT 164/88	MT 164/60	WT164/86	WT 164/60		
P3 (p.G13D)	0.05	0.01	0.01	0.10	0.04	0.06	0.17	0.25	0.19	0.30		
P14 (p.G130)	0.10	0.08	0.03	0.03	1.72*	0.66	0.79	0.30	2.09*	08.0		
P22 (p.G130)	0.68	0.03	0.01	0.29	0.19	0.07	0.45	0.17	0.65	0.24		
P26 (p.G130)	0.01	0.80	0.00	0.30	0.06	0.06	0.12	0.11	0.16	0.15		
P32 (p.G130)	0.06	8.80	0.80	0.50	0.30	Q.13	NA	NA	0.60	0.27		
P49 (p.G130)	0.09	0.02	0.02	0.00	0.02	0.02	0.24	0.18	0.22	0.17		
P71 (p.G12V)	1.52*	0.29	0.28	0.44	0.14	0.10	0.18	0.16	0.32	0.23		
P114 (p.G12V)	0.02	0.81	0.01	0.14	0.07	0.05	0.44	0.30	0.54	0.36		
P1 (p.012V)	0.12	0.01	0.02	0.16	0.01	0.02	0.09	0.14	0.09	0.14		
P80 (p.G130)	NA	NA	NA	0.29	0.11	0.09	NA	NA	0.39	0.31		
P74 (p.G13D)	NA	NA	NA	0.41	0.13	Q.13	NA	NA	0.32	0.31		
P81 (p.G130)	NA	NA.	NA	0.41	0.18	0.16	NA	NA	0.45	0.39		
Mean	0.23	0.05	0.04	0.34	0.12	0.13	0.31	0.20	0.36	0.31		
Std. Deviation	0.52	0.09	0.08	0.20	0.09	0.17	0.24	0.07	0.18	0.17		
Std. Error of Mean	0.17	0.03	0.03	0.06	0.03	0.05	0.08	0.03	0.06	0.05		
Lower 95% CI of mean	-0.1704	-0.02149	-0.02496	0.2157	0.05713	0.0188	0.11	0.1394	0.2336	0.1963		
Upper 95% CI of mean	0.635	0.1223	0.1043	0.473	0.1732	0.2392	0.508	0.2625	0.4815	0.4184		

Table 3. Dil obtained in mCRC patients using the KRAS p.G13D or p. G12V assay

Sample	MT 140/95	MT 140/60	WT 140/05	WT 140/60
P59PL1	NA	NA	0.7	0.66
P97PL1	NA	NA	0.75	0.64
PS8PL1	0.7	0.58	0.56	0.40
P68PL1	NÁ	NA	0.81	0.54
P50PL1	0	C	0.74	0.66
P39PL2	0.53	0.26	0.79	0.69
P48 PL5	0.58	0.54	0.63	0.59
P116PL4	NÁ	NA	0.55	0.47
P12PL5	0.82	0.74	0.65	0.64
P48 PL3	071	0.57	0.67	0.58
P48 PL7	0.65	0.58	0.59	0.54
P97 PL5	NA	NA	0.65	0.6
P13PL4	1.08	0.67	0.98	0.65
lean	0.57	0.49	0.68	0.61
Std. Deviation	0.35	0.26	0.11	0.1
otd. Error of Mean	0.11	0.088	0.031	0.029
ower 95% CI of mean	0.32	0.29	0.61	0.55
Jpper 95% CI of mean	0.82	0.7	0.75	0.67

Tables 3 and 4. Dll values for mutant and wild-type sequences detected in plasmatic DNA of mCRC (table 3) and mNSCLC (table 4) patients, respectively. Data with an asterisk "*"were not considered for analysis.NA: Non available data due to the absence of ctDNA (CctDNA=0ng/mL) for these patients.

Tables 5 and 6.

	mCRC patients - KRAS p.G13D or p.G12V mutation												
Canada	CelDNA (ng/inL)	CatDNA (ng/mL)	CciDNA (ng/inL)	CctDNA (ngimL)	CetDNA (ng/mL)	CwtDNA (ng/mL)	CwtDNA (ng/mL)	CwIDNA (ng/inL)	%MT	%AIT	%MT	%MT	
campas	302 bp	164 bp	86 bp	60 bp	302 bp	164 bp	86 bp	60 bp	302 pb	164 bp	26 bp	60 bp	
Pa	0.26	5.65	32.93	22.88	3.27	17.95	02.4	59.49	7.89	23.94	26.27	27.78	
P14	0.04	0.38	0.46	1.27	11.27	13.58	6.53	17.09	0.35	2.72	6.85	6.04	
P22	1.1	14,36	31.94	82.17	9.24	31.59	49,85	130.58	10.64	31.25	39,53	38.62	
P28	0.05	4.65	38.95	42.24	4.14	10.96	67.88	71.76	1.19	29.75	36.46	37.06	
P32	0	0.05	0.1	6.5	0.81	1.84	3.08	6.69	0.00	2.85	3.14	6.77	
P419	1.49	16.8	70.84	\$5.67	2,98	32.64	147.29	191.00	32.A3	33.98	32,48	33.36	
P71	1.74	1.07	5.96	6.63	0.699	2.22	6.63	8.78	63.74	32.52	45,58	40,40	
P114	0.11	5.73	13.11	18.9	2.1	15.46	26.85	40.68	4.90	27.04	31.24	31.80	
P1	4.33	34.67	401.05	254.47	4.05	24.79	261.25	180.62	51.67	58.31	56.78	58,49	
P90	0	0	0	0	0.52	1.76	4.5	5.61	0.00	0.00	90.0	00.0	
P74	0	0	0	0	0.87	2.09	6.46	6.76	0.00	0.00	0.00	96.9	
P61	0	0	0	0	0.64	1.57	3.6	4.04	0.00	0.00	0.00	00.0	

Table 5. CIDNA and WT DNA concentrations, and percentage of mutation in mCRC patients.

	NSCLC patients - EGFR p.L858R mutation												
Sample	CadDNA (ng/mL)	ColDNA (ng/mL)	ColDNA (ng/mL)	CutDNA (sg/mL)	CatDNA (ng/mL)	CurDNA(rightL)	%MT	KMT	%MT				
· · ·	140.60	quee	ouop	140.00	queo	ou op	140 00	an an	ou pp				
P\$\$PL1	0	0.02	0.02	11.03	15.73	16.76	0.00	0.13	0.12				
P97PL1	0	0	0	2.02	2.58	3.14	0.00	0.00	0.00				
P66PL1	3.95	6,64	6.78	30.58	54.45	65.07	11.44	9,39	0.31				
POSPL1	0	0	0	54.64	89.01	101.96	0.00	0.00	0.00				
PS0PL1	0	8	0	3.21	4.35	4.88	0.80	0.00	0.00				
P39PL2	0.06	0.07	0.2	6.22	7.91	8.98	96.0	0.86	2.18				
P48 PL5	9.3	15.94	17.16	82	13.1	13.91	53.14	54.88	55.23				
P1167LA	0.3	0.09	0.2	53.69	97.56	113.91	0.56	0.08	0.18				
P12PL5	2.17	2.66	2.95	13.17	20.16	20.72	14.15	11.66	12.46				
P46 PL3	0.33	0.47	0.58	11.7	17.39	20.29	2.74	2.63	2.78				
P48 PL7	12.06	18.3	20.92	15.48	26.43	28.44	43.79	40.91	42.38				
P97 PL5	0	0	0	5.57	8.44	8.27	0.00	0.00	0.00				
PISPLA	0.55	0.52	0.63	13.56	14.07	15.73	3.90	3.56	3.85				

Table 6. CIDIKA and WT DNA concentrations, and percentage of mutation in NSCLC patients.

Tables 5 and 6. Concentration of ctDNA (CctDNA (ng/mL)), of circulating wild-type DNA (CwtDNA (ng/mL)) and mutation percentage in mCRC patients' samples using the four size-assays (302, 164, 86 and 60 pb) (Table 5) and in NSCLC patients using the three size-assays (140, 85 and 60 bp) (Table 6).

Tables 7 (left) and 8 (right).

Healthy donors	s - EGFR p.L85	8R Assay		Health	ny donors - KF	Healthy donors - KRAS p.G13D assay							
Sample ref.	DII 140/85	DII 140/60	Sample	DII 302/164	DII 302/86	DII 302/60	DII 164/86	DII 164/60					
M'4	0.74	0.65	2		0.05								
M'5	0.67	0.63	4		0.42								
M'6	0.63	0.58	10				0.49	0.76					
F'1	0.84	0.73	FNS1		0.44259944	0.39							
F'2	0.74	0.77	F1	0.51		0.17	0.43	0.34					
F'3	0.72	0.66	F2	0.44		0.12		0.36					
F'4	0.74	0.67	F2					0.26					
M'3	0.58	0.55	F3	0.3		0.11		0.36					
F'5	0.61	0.72	F4	0.21		0.07		0.34					
M'2	0.72	0.63	F5	0.29		0.15		0.52					
M7	0.65	0.67	F6	0.12	0.45	0.19		0.77					
M1'1	0.78	0.64	F6	0.24		0.36		0.57					
M1	1	0.68	F6			0.03		0.58					
M2	/	0.62	F7	0.28		0.12		0.44					
M3	/	0.89	F8	1.29	0.37	0.31	0.29						
M4	/	0.7	F'8	0.07		0.27							
M5	/	0.6	F"8	0.37									
M6	/	0.66	F 9			0.47							
F5	1	0.83	F11			0.2							
F6	1	0.80	F12					0.45					
F7	/	0.71	F18			0.25							
F8	/	0.72	<u>M'1</u>					0.6					
F1	/	0.67	NST		0.44	0.23							
F2	1	0.48	MNS1		0.45	0.12							
F3	1	0.60	MNS2	0.50	0.15	0.08		0.00					
F4	/	0.63	MI	0.53		0.14		0.26					
Mean	0.70	0.67	M2	0.56		U.39		0.69					
Std. Deviation	0.08	0.08	1/13	0.49		0.02		0.07					
Std. Error of Mean	0.02	0.02	1914	0.31		0.02		0.07					
CI95%+	0.65	0.65	NO MG	0.54		0.01		0.49					
CI95%-	0.75	0.71	N/7	0.04		0.03		0.00					
Table 7. Dll in HD u	sing the EGF5	p.L85R assav	NAS					0.20					
			M23			0.55		0.57					
			M24			0.00							
			Mean	0.35	0.31	0.22	0.86	0.43					
			Std. Deviation	0.15	0.22	0.16	0.91	0.20					
			Std. Error of Mean	0.04	0.07	0.034	0.46	0.045					
			CI95%+	0.26	0.14	0.15	-0.60	0.33					
			CI95%-	0.44	0.48	0.29	2.31	0.52					

Table 8. DII in HD using the KRAS p.G13D assay

Tables 7 and 8. DII values obtained from plasmatic DNA of healthy donors analyzed with the EGFR p.L858R (table 7) and KRAS G13D assays (table 8), respectively. With an asterisk, data that were not taken into account because of a value equal to zero, rendering the DII estimation invalid.

Supplemental Information

Supplemental Figure 1. Primers and probe sequences

		KRAS o	.35G>T (p.G12V)							
Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Wild-type probe sequence	Mutated probe sequence						
AATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGC		60								
AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATAT	GETETATCETCAAGGCACTCT	85	E AUCICTACCCACCACCTC BACENEOSI T	E (FEAMI ACCOMACACTY INCOMENTS 2)						
AGGTACTGGTGGAGTATTTGATAGT	GerenarcencaAddeAcrer	164	5-9410/-CIACGCCACCACCIC-9140814FQ 7-3	S YORAM/ ACCOUNTENT OF THE SHITE /-S						
CTTAAGCGTCGATGGAGGAGT		302								
KRAS c.38G>A (p.G13D)										
Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Wild-type probe sequence	Mutated probe sequence						
AATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGC		60								
AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATAT	GETETATOETCAAGGCACTET	85	5'- MIC /- TGGTGGCGTAGGCA-/MAGRNEO*/-2'	5'-/6EANA/-CTCCTCACCTACCCA_/NACENEO*/-2'						
AGGTACTGGTGGAGTATTTGATAGT	acrematoeloaAdecacier	164	3-YVIC/-IGGIGOCETAGOCA/WORKEG /-3							
CTTAAGCGTCGATGGAGGAGT		302								
		EGFR c.2	2573T>S (p.1.656R)							
Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Wild-type probe sequence	Mutated probe sequence						
CCGCAGCATGTCAAGATCAC		60								
AGCCAGGAACGTACTGGTGA	TTTCTCTTCCGCACCCAGC	85	5'-/VIC/-AGTTTGGCCAGCCCAA-/MGBNPQ*/-3'	5'-/6FAM/-AGTTTGGCCCGCCCAA-/MGBNFQ*/-3'						
TEGENANGGENTENACTACT		140								

Supplemental Figure 2. PCR cycling program

		PCR cyc	ling program	
	Temp (C°)	Hold	Rampe Rate (°C/s)	Cycles
Pre-heating	50	2 min	0.6	1
Polymerase activation	95	10 min	0.6	1
Denaturation,	95	15 s	0.6	45
Annealing & Extension	60*	1 min	0.6	45
Incubation	98	10 min	0.6	1
Cooling	10	10 min	2	1

*64°C for KRAS



Supplemental Figure 3. Size distribution of ultrasonicator-fragmented genomic DNA confirmed using the Caliper system. One μ g of genomic DNA in 130 μ L water was pipeted in an appropriate vessel according to manufacturer's instructions (http://covarisinc.com/pre-analytical/afa-technology/). Acoustic bursts were delivered to samples with a peak incident power of 130W for 80 seconds, and a duty factor of 5%, thus tuning shearing forces to obtain a main pick located between 500 and 1000 bp. The size distribution of fragments was confirmed using the Caliper system (Labchip ® GX/GXII Microfluidic system (Perkin-Elmer), DNA assay HS or 5K reagent kit (Perkin-Elmer)).

Supplemental Figure 4.



Supplemental Figure 4. Concentration of circulating mutant (A) and wild-type (B) DNA and percentage of mutation in respective samples. These patients present very low amounts of tumor DNA in plasma. The assays targeting short fragments were used to compare the results: when there is ctDNA in plasma of these patients, the concentrations that are measured are higher with the 60 bp assay for both wild-type and mutant DNA.

Supplemental Figure 5.



Supplemental Figure 5. Comparison of DII in NSCLC patients depending on the time of sample collection: before treatment (PL1, plasma 1) and after treatment's beginning (>PL1, after plasma 1). No significant difference was observed.

References

1. 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. Mol Oncol. 2014;8(5):927-41. Epub 2014/04/05.

2. 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;6(224):224ra24. Epub 2014/02/21.

3. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nat Rev Cancer. 2011;11(6):426-37. Epub 2011/05/13.

4. Alix-Panabieres C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. Cancer discovery. 2016. Epub 2016/03/13.

5. Mouliere F, Thierry AR. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. Expert opinion on biological therapy. 2012;12 Suppl 1:S209-15. Epub 2012/05/19.

6. Yamada T, Iwai T, Takahashi G, Kan H, Koizumi M, Matsuda A, *et al.* Utility of KRAS mutation detection using circulating cell-free DNA from patients with colorectal cancer. Cancer science. 2016. Epub 2016/04/27.

7. Yang X, Zhuo M, Ye X, Bai H, Wang Z, Sun Y, *et al.* Quantification of mutant alleles in circulating tumor DNA can predict survival in lung cancer. Oncotarget. 2016. Epub 2016/03/19.

8. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancergenetics in the blood. Nat Rev Clin Oncol. 2013;10(8):472-84. Epub 2013/07/10.

9. Zonta E, Nizard P, Taly V. Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research. Advances in clinical chemistry. 2015;70:197-246. Epub 2015/08/02.

10. Kamel AM, Teama S, Fawzy A, El Deftar M. Plasma DNA integrity index as a potential molecular diagnostic marker for breast cancer. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2015. Epub 2015/12/20.

11. Sriram KB, Relan V, Clarke BE, Duhig EE, Windsor MN, Matar KS, *et al.* Pleural fluid cell-free DNA integrity index to identify cytologically negative malignant pleural effusions including mesotheliomas. BMC Cancer. 2012;12:428. Epub 2012/09/27.

12. Ellinger J, Muller DC, Muller SC, Hauser S, Heukamp LC, von Ruecker A, *et al.* Circulating mitochondrial DNA in serum: a universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies. Urologic oncology. 2012;30(4):509-15. Epub 2010/09/28.

13. 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. Epub 2011/09/13.

14. 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;52(6):1062-9. Epub 2006/05/26.

15. Salvianti F, Pinzani P, Verderio P, Ciniselli CM, Massi D, De Giorgi V, *et al.* Multiparametric analysis of cell-free DNA in melanoma patients. PLoS One. 2012;7(11):e49843. Epub 2012/12/05.

16. Pinzani P, Salvianti F, Zaccara S, Massi D, De Giorgi V, Pazzagli M, *et al.* Circulating cell-free DNA in plasma of melanoma patients: qualitative and quantitative considerations. Clin Chim Acta. 2011;412(23-24):2141-5. Epub 2011/08/16.

17. Brisco MJ, Latham S, Bartley PA, Morley AA. Incorporation of measurement of DNA integrity into qPCR assays. BioTechniques. 2010;49(6):893-7. Epub 2010/12/15.

18. Mead R, Duku M, Bhandari P, Cree IA. Circulating tumour markers can define patients with normal colons, benign polyps, and cancers. Br J Cancer. 2011;105(2):239-45. Epub 2011/06/30.

19. Mouliere F, Rosenfeld N. Circulating tumor-derived DNA is shorter than somatic DNA in plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(11):3178-9. Epub 2015/03/04.

20. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, *et al.* Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. J Clin Oncol. 2006;24(26):4270-6. Epub 2006/09/12.

21. Jiang P, Chan CW, Chan KC, Cheng SH, Wong J, Wong VW, *et al.* Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(11):E1317-25. Epub 2015/02/04.

22. Zonta E, Garlan F, Pecuchet N, Perez-Toralla K, Caen O, Milbury C, *et al.* Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations. PLoS One. 2016;11(7):e0159094. Epub 2016/07/16.

23. 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;2(61):61ra91. Epub 2010/12/15.

24. Mouliere F, El Messaoudi S, Gongora C, Guedj AS, 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):319-28. Epub 2013/06/05.

25. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, Le Corre D, Mazutis L, Salem CB, *et al.* Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. Lab Chip. 2011;11(13):2156-66. Epub 2011/05/20.

A.II.2. ETUDE DU LIEN ENTRE LE PROCESSUS DE MORT CELLULAIRE ET LA FRAGMENTATION DE L'**ADN** CIRCULANT.

A.II.2.1. Introduction

Les résultats obtenus dans le chapitre précédent démontrent une fragmentation importante de l'ADNtc, qui pourrait témoigner d'une libération majoritairement apoptotique. Une telle observation est sujet à controverse depuis les premières études portant sur l'origine des fragments circulants^{316,317}.

Dans l'étude de Jahr *et al.*, les auteurs avaient utilisé l'ADN libéré dans le milieu de culture et déterminé la quantité d'ADN par qPCR, à différents temps et sous des conditions différentes. La libération des ADN dans le surnageant mimait ainsi la libération d'ADNtc dans la circulation sanguine. Des fragments de très grandes tailles et des fragments de petites tailles (<500pb) ayant été observés, les auteurs ont suggéré que les cellules apoptotiques et les cellules nécrotiques étaient à l'origine de la libération d'ADN tumoral plasmatique. Jahr *et al.* ont appliqué leur méthode à des échantillons de plasma de patients, et ont pu faire le même constat.

D'autres études, qui ont mesuré l'intégrité des séquences non codantes *ALU* et *LINE1*, ont suggéré que les fragments mesurés étaient préférentiellement libérés par les cellules tumorales non apoptotiques ou nécrotiques, avec des tailles variant de 200 à 400 pb^{190,191}.

Dans le but d'explorer cet aspect, nous avons réalisé un test d'induction de l'apoptose et de la nécrose des cellules, d'après le modèle décrit par Jahr *et al.* La méthode de PCR digitale en gouttelettes couplée aux tests de détection de mutation décrite dans le chapitre précédent a été utilisée pour évaluer l'intégrité des ADN libérés dans le milieu cellulaire, afin de déterminer si le processus de mort cellulaire impliquait une différence de fragmentation de l'ADN libéré.

A.II.2.2. Matériel et méthodes

Mesure de l'intégrité

La fragmentation des ADN issus de cellules de lignées LOVO et H1975, et de surnageant issu de ces cellules a été évaluée, suite à l'induction de la mort cellulaire par nécrose ou apopotose.

Le calcul de l'index d'intégrité, DII, correspond aux ratios 140/60 pb dans le cas de la lignée cellulaire H1975 et 302/60 dans le cas de la lignée cellulaire LOVO. Dans notre test, la fragmentation de l'ADN libéré est la même qu'il s'agisse d'ADN muté ou d'ADN non muté, puisqu'ils proviennent des mêmes cellules. En outre, aucun processus de libération relatif à l'origine tumorale ou non tumorale n'entre en compte (au contraire des conditions pathologiques chez les patients). Pour cette raison, l'ADN total a été considéré pour le calcul du DII.

Tests d'induction de l'apoptose et de la nécrose sur lignées cellulaires.

Cinq cent mille cellules ont été étalées dans une boîte de Pétri de 10cm^2 . L'apoptose a été induite en utilisant 1 µM de solution de staurosporine (Sigma-Aldrich, Missouri, États-Unis). Les cellules et les surnageants ont été recueillis à différents moments de l'induction de l'apoptose (3h, 6h, 12h, 24h, 48h)^{166,317}. La nécrose a été induite par choc thermique (60°C dans la cellule incubateur de culture).

Les cellules et les surnageants ont été recueillis au bout de 10 min, 20 min, 40 min et 1h de chauffage. La vérification de l'induction de l'apoptose ou de la nécrose a été réalisée par la détection de la protéine PARP, l'un des premiers substrats clivés et inactivés par des protéases (caspases) durant l'apoptose (Western Blot), et par l'observation des corps apoptotiques, non détectés dans le cas de la nécrose (microscopie à épifluorescence).

Extraction des protéines, analyse par Western Blot pour la détection de la protéine PARP clivée.

Les protéines ont été extraites des cellules en utilisant la protéine M-PER® (Thermo Fisher Scientific) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases (HaltTM Protease/Phosphatase Cocktail Inhibitors, Thermo Fisher Scientific). Les concentrations en protéines ont été mesurées à l'aide du kit de dosage de protéine BCA PierceTM (Thermo Fisher Scientific). Cinquante microgrammes de protéines ont été séparées par SDS-PAGE et transférés sur une membrane de 0,2 um de nitrocellulose (BioRad, Californie, Etats-Unis). Les anticorps primaires (dilution 1: 1000 pour la PARP, # 9542S Cell Signaling, 1: 10.000 dilution pour l'actine, # A5060 Sigma Aldrich) ont été visualisés en immunufluorescence, en utilisant des anticorps conjugués à des anticorps polyclonaux secondaires (# 7074S Cell Signaling). La détection est réalisée par réaction avec l'ECL (GE Healthcare). Les anticorps utilisés pour la détection des protéines ont été dilués dans un mélange lait-TBS (5%).

Caractérisation de la viabilité cellulaire par coloration Hoehst, iodure de propidium et visualisation au microscope à épifluorescence.

L'induction de la mort cellulaire a été vérifiée par coloration Hoechst, et par une solution d'iodure de propidium (0,10 et 0,005 mg / mL dans du PBS, respectivement - Thermo Fisher Scientific) : les cellules vivantes rejettent l'iodure de propidium (PI) tandis que la coloration Hoechst marque les cellules vivantes. Le colorant Hoechst est facilement capté par toutes les cellules au début de l'apoptose alors que l'iodure de propidium, colorant non perméant de la membrane, est exclu. Il est ainsi possible de visualiser les cellules mortes marquées au PI et de les différenier des cellules apoptose précoce (présence de corps apoptotiques marqués par le colorant Hoechst). Les cellules ont été observées et comptées en microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse TE-2000, 20x) pour la détermination du pourcentage de mort cellulaire dans chaque condition. Ce comptage a été réalisé par une extrapolation à partir du nombre de cellules identifiées par miscroscopie sur la lame, connaissant le nombre total de cellules récupérées.

A.II.2.3. Résultats

Détermination des conditions d'analyse : temps d'induction de la nécrose et de l'apoptose (Figure 46).

L'analyse par western blot de l'extrait protéique de cellules a permis de vérifier l'induction de l'apoptose par traitement à la staurosporine. La détection de la sous unité PARP, produite dans le processus apoptotique, confirme la mort cellulaire par apoptose, dès 3h d'incubation³²⁰.

Afin de déterminer quels temps d'incubation permettaient d'obtenir un nombre conséquent de cellules en mort cellulaire, les conditions ont été répétées et des images en microscopie à épifluorescence ont permis de déterminer les pourcentages de mort cellulaire.

Au bout de 6h sous traitement à la staurosporine, 20% et 40% de cellules LOVO et H1975 étaient mortes respectivement. Ce temps a donc été choisi pour les analyses de la fragmentation de l'ADN.

Concernant la nécrose, 1h d'incubation a semblé pertinent en regard de 40 minutes, au bout desquelles seulement moins de 20% de mort cellulaire était observés dans les deux lignées. En revanche à 1h d'incubation, 48% et 88% de cellules LOVO et H1975, respectivement, étaient nécrotiques.



Figure 46. Test de viabilité des cellules LOVO et H1975, vérification de l'induction de l'apoptose et de la nécrose. (*A*) Evaluation du clivage de la protéine PARP extraite de cellules LOVO (panel de gauche) et de cellules H1975 (panel de droite) par Western Blot. Différentes durées d'induction de l'apoptose (par traitement à la staurosporine) et de la nécrose (par choc thermique) ont été testées. Le traitement par DMSO a été réalisé dans le but de vérifier un biais potentiel du DMSO sur l'action de la staurosporine. (*B*) Détermination des pourcentages de mort cellulaire par le rapport entre le nombre de cellules colorées positivement au iodure de propidium et le nombre de cellules colorées par la coloration Hoechst. Les résultats ont été obtenus par le comptage des cellules au microscope à épifluorescence (obectif 20x). (*C*) Images prises au microscope à épifluorescence en immersion (objectif 40x). Les cellules traitées au DMSO montrent une coloration homogène du noyau. Au contraire, dans les cellules en apoptose précoce, des corps apoptotiques peuvent être observés par la coloration Hoechst. Les cellules peuvent être observés par la coloration Hoechst. Les cellules cellules colorées par la coloration des comptages peuvent être observés par la coloration Hoechst. Les cellules dans le noyau des cellules en apoptose précoce, des corps apoptotiques peuvent être observés par la coloration Hoechst. Les cellules nécrotiques sont marquées par le PI qui est entré dans le noyau des cellules endommagées.

Calcul du DII dans les différentes conditions : le processus de mort cellulaire joue-t'il un rôle sur la fragmentation des ADN libérés dans le surnageant ?

Suite à la détermination des temps auxquels les cellules étaient pour beaucoup mortes par apoptose ou par nécrose, nous avons évalué l'impact du processus de mort cellulaire sur la taille de l'ADN extrait des cellules ou du surnageant.

Pour cela, nous avons déterminé la fragmentation par le test qui a été conçu pour détecter les différentes tailles d'allèles *KRAS* ou *EGFR* mutés (voir Matériel et Méthodes du **sous-chapitre A.II.1**, article).

Dans le cas d'ADN extrait de cellules, le DII est proche de 1, tandis qu'il varie dans le cas d'ADN extrait de surnageant (**Figure 47**). L'ADN extrait de surnageant est plus fragmenté que l'ADN extrait des cellules, comme attendu, malgré l'absence de différence significative. En outre, la nécrose et l'apoptose ne semblent pas mener à une différence de fragmentation des fragments d'ADN libérés.



Figure 47. DII obtenus par les analyses en PCR digitale en gouttelettes des ADN de cellules ou de surnageant issus de la culture des lignées (A) LOVO ou (B) H1975. Les ratios 302/60 et 140/60 ont été calculés respectivement, dans les conditions contrôle (pas de traitement), DMSO (1µM), induction de l'apoptose (« A 6h » ; staurosporine, 1µM) ou de la nécrose (« N 1h » ; choc thermique, 56°c). Les données sont indiquées dans la Table 1 ci-dessous.

	140/60 H1975 ADN de cellules			140/60 DNA H1975 ADN de sumageant			302/60 LOVO ADN de cellules			302/60 LOVO ADN de surnageant		
	Moyenne	Ecart-type	N	Moyenne	Ecart-type	N	Moyenne	Ecart-type	N	Moyenne	Ecart-type	N
Contrôle	1,13	0,21	3	0,77	0,03	3	0,99	0,17	3,00	0,74	0,17	3
DMSO	1,03	0,16	3	0,81	0,13	3	0,89	0,04	3,00	0,83	0,22	3
A 6h	0, 9 4	0,08	3	0,88	0,15	3	0,92	0,11	3,00	0,89	0,21	3
N 1h	0,82	0,25	3	0,75	0,11	2	0,96	0,06	3,00	0,94	0,28	3

Tableau 6. DII obtenus pour les ADN de cellules LOVO (A) et H1975 (B), dans les conditions appliquées pour le test : contrôle (pas de traitement), DMSO (1 μ M), induction de l'apoptose (staurosporine, 1 μ M) ou de la nécrose (choc thermique, 56°c).

A.II.2.4. Conclusion

La comparaison des DII obtenus pour les ADN de cellules ou de surnageants indique une différence, les ADN de surnageants étant plus fragmentés dans toutes les conditions d'expérience. Cependant, aucune variation n'est significative, en dehors de la condition sans traitement (contrôle). La comparaison des DII d'ADN issus de nécrose ou d'apoptose n'indique pas de différence significative. Nous ne pouvons donc pas déterminer l'impact du type de mort cellulaire sur l'intégrité de l'ADN libéré dans le milieu de culture.

Notre test, en dépit de la caractérisation moléculaire vérifiant l'induction de la mort cellulaire par nécrose ou apoptose, ne nous permet pas de conclure en comparaison aux résultats de la littérature.

En effet, nous nous attendions à une libération d'ADN très fragmenté dans les conditions d'apoptose, comme cela a été observé par Jahr *et al.*, avec la présence, majoritairement, de fragments de tailles de nucléosomes et de di-nucléosomes. Une telle taille de fragment aurait dû aboutir à l'obtention de DII très inférieurs à 1 dans la mesure où nos tests ciblent des fragments de taille proche de 200-300 pb pour l'amplicon long, et des fragments très courts (60 pb) pour l'amplicon le plus petit. Il est à noter que les études précédentes n'ont pas mesuré le DII d'ADN libéré dans le surnageant de cultures cellulaires, ne donnant ainsi aucun élément de comparaison. Concernant la nécrose, les auteurs avaient observé des fragments de plus de 10 000 pb, ce qui correspondrait à un DII de 1 ou très proche de 1, tous les fragments étant bien plus grands que les séquences ciblées par nos tests.

Cependant, notre approche présente certaines limitations. Notamment, l'induction de l'apoptose n'est pas complète dans les conditions choisies, avec seulement 20% de cellules LOVO apoptotiques, et 48% de cellules H1975 apoptotiques. Cette proportion limitée de cellules apoptotiques peut avoir un impact sur la libération de l'ADN. Une trop faible proportion d'ADN libéré dans le surnageant a pu limiter nos observations. L'extraction de l'ADN de surnageant pourrait avoir limité le rendement de l'expérience, en particulier dans le cas de petits fragments. Il pourrait être bénéfique de tester l'extraction d'ADN par les kits utilisés pour l'ADN plasmatique (QiaAmp Circulating Nucleic Acids de Qiagen).

Concernant les lignées utilisées dans ce test, elles pourraient induire un biais sur l'induction de la mort par apoptose. En particulier, on observe sur la Figure 1 que la lignée LOVO est plus résistante à la staurosporine que la lignée H1975, dont le pourcentage de mort cellulaire est 2.5 fois plus élevé que pour les cellules LOVO à 6h d'induction (20% pour les cellules LOVO, 50% pour les cellules H1975). Il serait donc pertinent de tester en parallèle les mêmes conditions d'expérience sur une lignée non dérivée de cellules cancéreuses.

Pour aller plus loin, dans le cas où un test permette de discriminer l'ADN libéré par apoptose de celui par nécrose, nous pourrions imaginer un test qui permettrait de comprendre le(s) mécanisme(s) de libération de l'ADN tumoral circulant, basé sur le traitement de cellules dérivées de lignées cancéreuses avec des agents induisant une résistance. Par exemple, les cellules H1975 seraient traitées à l'erlotinib, et il serait possible de mesurer la fragmentation de l'ADN libéré dans le surnageant afin de déterminer s'il s'agit de nécrose ou d'apoptose, ou encore d'un mélange des deux processus.

A.II.3. AUTRE APPROCHE DE L'EVALUATION DU PROFIL DE DISTRIBUTION EN TAILLE DE L'**ADN**TC : UTILISATION D'UN SYSTEME MINIATURISE DE SEPARATION DE L'**ADN** (**BIAB**OOSTER, **P**ICOMETRICS, FRANCE).

A.II.3.1. Introduction

Dans le cadre de l'étude de l'intégrité de l'ADNtc (présentée en **A.II.1**), nous nous sommes intéressés à une approche de quantification et de séparation des fragments d'ADN selon leur taille, et ne nécessitant pas d'étape d'amplification de l'ADN.

Afin de caractériser le profil de taille de l'ADNtc, nous avons utilisé une première technique basée sur un système microfluidique d'électrophorèse capillaire (Caliper LabChip®, PerkinElmer³²¹). Cette technique offre une large gamme dynamique d'analyse mais présente une sensibilité limitée en particulier pour la détection de l'ADN circulant.

La société Picometrics a développé un système basé sur l'électrophorèse capillaire qui permet de séparer et de quantifier des fragments allant de quelques dizaines de paires de bases à plus de 1 000 paires de bases (voir plus bas). Dans notre démarche de caractérisation de l'ADN circulant, cette technique présentait l'avantage de pouvoir générer des profils de distribution de taille par une approche directe, hautement sensible et rapide.

Récemment, des études ont porté sur les profils de ditribution en taille de l'ADNtc dans différents types de cancers en comparaison à ceux de l'ADN circulant de patients sains, obtenus par une méthode de séquençage^{133,319}. Ces travaux ont montré qu'il existait un décalage de la taille du pic principal, qui serait plus faible de quelques dizaines de paires de bases chez les patients. Il s'agirait d'une différence faible entre les profils de patients et ceux de sujets sains, ce qui suggère la nécessité d'outils sensibles pour évaluer l'intégrité de l'ADNtc.

L'objectif de ce travail additionnel sur l'intégrité de l'ADNtc était de comparer les résultats observés à ceux obtenus par PCR digitale en gouttelettes, et de collecter des données complémentaires à l'aide d'une technique hautement sensible.

A.II.3.2. Matériel et méthode

Les matériels et méthodes relatifs aux échantillons cliniques et de sujets sains (collection, extraction, stockage) sont décrits dans le chapitre précédent.

La technique Caliper LabChip® (PerkinElmer) est décrite dans le chapitre précédent.

Technologie BIABooster (Picometrics)

La société Picometrics (Labège, France) a optimisé une technique de séparation de particules selon leur charge et leur poids moléculaire, sur la base d'un système d'électrophorèse capillaire combiné à un système de détection de fluorescence.

Cette technologie, décrite par l'équide de Bancaud³²², combine l'application d'un champ électrique et d'un contre-écoulement hydrodynamique sur le mélange contenant l'ADN et le tampon viscoélastique, qui est injecté dans le capillaire (voir **Figure 48**), générant l'apparition de forces transversales orientées vers les parois. Ces forces augmentent en fonction du poids moléculaire de l'ADN, et donc induit une diminution progressive de la vitesse de migration de l'ADN qui déclenche la

séparation selon la taille des fragments d'ADN, dans les capillaires. La séparation des marqueurs de poids moléculaire dans la gamme 100 pb-1 kpb est atteinte en moins de 30 minutes, dépassant ainsi l'électrophorèse sur gel qui prend approximativement 3 heures pour un échantillon.

Une zone de réduction du diamètre des capillaires, où le champ électrique appliqué et le flux de l'écoulement hydrodynamique sont modulés, permet d'ajuster les forces transversales de façon à bloquer les molécules d'ADN, qui s'accumulent.

Un champ électrique est appliqué tandis qu'un flux laminaire s'exerce ce qui fait migrer les particules. Ces dernières se stabilisent d'abord à un « front » de concentration. Suite à l'arrêt du champ électrique, les particules migrent, les plus petites étant les premières à être emportées, en raison de leur plus faible poids moléculaire.



*Figure 48. Technologie BIABooster développée par la société Picometrics sur la base du système décrit par Bancaud et al*³²². (A) Forces actionnées sur le fluide viscoélastique (buffer) mélangé à l'ADN injecté dans le capillaire. La somme de la force hydrodynamique et de la force électrophorétique génère une force transversale de cisaillement, qui pousse les fragments sur les parois du capillaire. (B) Résultats de l'expériences d'enrichissement, au bout de 30 secondes d'application des forces, selon les paramètres d'actionnement (pression (bar), champ électrique (Volt)) indiqués dans l'encart. (C) Système BIABooster utilisant une puce modifiée à partir du système Agilent7100 pour faire passer le capillaire de séparation. Un système de détection « LIF » a été développé par Picometrics.

Avec ce système, la taille des fragments peut être mesurée à une sensibilité atteignant 0,02 ng / mL. La gamme d'analyse de cette technique varie de quelques dizaines de paires de bases à 2 kb. Les pics de fragments d'ADN, ainsi que les concentrations correspondantes, sont évalués par l'intensité de fluorescence (RFU) (**Figures 49, 50**). En normalisant les résultats obtenus par rapport à ceux de l'analyse d'un marqueur de taille, de concentration connue, la concentration des fragments peut être calculée. La société a mis au point un code informatique (Matlab) qui permet d'interpréter les données.

A.II.3.3. Résultats et discussion

Une analyse sur gel d'électrophorèse miniaturisé a été réalisée (Caliper LabChip) pour 3 échantillons d'ADN plasmatique de patients atteints de CCRm et 3 échantillons de patients atteints de CPm (figure 2). Pour les échantillons suffisamment concentrés en ADN circulant, un pic d'environ 150 pb est observable. Pour la plupart des échantillons d'ADN plasmatique, la taille du pic majoritaire est centrée sur celle du complexe nucléosomique correspondant à des fragments libérés dans des conditions apoptotiques, comme suggéré par Lo *et al.*¹³³ et confirmé récemment par Underhill *et al.*³¹⁹.

La quantité limitée de matériel analysable, en raison d'échantillons cliniques peu concentrés, a rendu l'analyse de certains profils de distribution en taille d'ADNtc non réalisable (en dessous de la limite de détection du système) (non présenté).



Figure 49. Résultats de l'analyse par le système Caliper de l'ADN plasmatique de patients atteints (A) de cancer du poumon métastatique (CPm) ou (B) de cancer colorectal métastatique (CCRm). Un pic majoritaire est observé autour de 150 pb, et parfois un second pic, aux environs de 300 pb. Les gels miniaturisés sont représentés (gauche et droite), la présence d'une première bande à 150 pb est visible, et celle d'une seconde, à environ 300 pb, est parfois distinguable.

Analyse du profil d'ADN circulant pat la technologie BIABooster.

En utilisant le système BIABooster, le profil de distribution de l'ADN plasmatique a été déterminé chez des individus sains (N=15) ou atteints de cancers (CCm, N=8 ; CPm, N=9) (**Figure 53**). Exemple de profils de distribution en taille des ADN circulant chez 2 patients CCRm (A), 2 patients CPm(B) et 2 sujets sains (C), obtenus par la technique BIABooster.



Figure 50. Exemples de profils de distribution en taille des ADN circulants de patients (A, CCRm ; B, CPm) et de sujets sains (C), mesurés par le système BIABooster.

Cette technique a permis de détecter de l'ADN dans des échantillons présentant des concentrations aussi faibles que 0,02 ng / mL, s'affranchissant ainsi de la sensibilité limitée du système présenté en Figure 52.

Les valeurs moyennes de ces 2 pics majoritaires observés (**Figures 50, 51**) ont été calculés chez les patients atteints de cancer. Le premier pic mesure en moyenne à $141,4 \pm 9,0$ pb et le second pic mesure en moyenne $285,7 \pm 22.2$ bp. Chez les sujets sains, les valeurs moyennes de taille des pics observés sont pour le premier pic $149,0 \pm 7,0$ pb et pour le second pic $297,3 \pm 9.4$ bp. Ces données suggèrent une différence d'environ 10 pb entre circulation fragments chez les patients cancéreux et les personnes en bonne santé.

La **Figure 51** présente les résultats obtenus à partir de l'analyse des échantillons provenant de patients atteints de CCRm et CPm, ainsi que des sujets sains. Les pics considérés correspondent aux tailles de fragments compris entre 0-240pb pour le premier pic et 240-370pb pour le second pic détecté. Le calcul de l'aire sous la courbe permet de calculer les ratios des deux principaux pics observés (**Figure 51**). De cette façon, il est possible d'évaluer une potentielle différence les profils de patients en comparaison aux individus sains par le calcul du DII.



Figure 51. Analyse par le système BIABooster des profils de distribution observés par le système BIAB en taille des ADN circulants de patients CCRm (A), CPm (B) et d'un sujet sain (C). Les gammes de tailles utilisées pour séparer les pics sont 0-240 / 240-370 / 370-580 / 580-2000 pb. Les chiffres indiqués sur chaque barre bleue correspondent à la concentration estimée sous le pic en question.

Les résultats obtenus par la technique BIABooster pour l'analyse d'échantillons de sujets sains et de patients atteints de CCRm et de CPm sont représentés en **Figure 52**. On observe que les valeurs de DII obtenues pour les patients CPm sont significativement différentes des valeurs de DII chez les sujets sains (p=0.03).



Figure 52. *DII obtenus d'après les résultats d'analyse par BIABooster des échantillons d'ADN plasmatique de patients atteints de cancer du poumon métastatique (CPm, N=9) ou de cancer colorectal métastatique (CCRm, N=8), et de sujets sains (N=15).* Les moyennes ± écart-type sont les suivants : CCRm : 0,51±0,35 ; CPm : 0,44±0,18 ; Sujets sains : 0,81±0,44. Test statistique : t-test paramétrique.

Comparaison des résultats obtenus en PCR digitale en gouttelettes et par le système BIABooster.

Les valeurs absolues de DII en observant chaque sujet ne sont pas identiques entre les deux méthodes, cependant, les variations inter-individus semblent suivre la même tendance (figure 5A) et les moyennes des DII observés par les deux techniques sont très proches (**Figure 53**).



Figure 53. Comparaison des résultats obtenus par PCR digitale en gouttelettes et par le système BIABooster. A) Comparaison des résultats obtenus par BIABooster (barres noires) et des résultats obtenus par le test de PCR digitale en gouttelettes décrit en Chapitre A.II.1. (barres bleues). B) Comparaison des valeurs : les moyennes de DII obtenue par le système BIABooster et PCR digitale en gouttelettes sont 0,53±0,27 et 0,51±0,26, respectivement.

Il existe une corrélation entre l'indice d'intégrité 300/60 bp et le ratio 2^e/1^{er} pic du BIABooster selon le type d'échantillon observé (**Figure 56, Panel B**).

Pour les échantillons de CCRm, on obtient une corrélation entre les DII mesurées par les deux techniques (r²=0,98); cependant, l'analyse de seulement 4 échantillons est prise en compte dans le calcul de corrélation, dont 1 éloigné des 3 autres qui influence le calcul. Concernant les échantillons CPm, les résultats sont également corrélés (r²=0.95). L'analyse est cependant plus significative puisqu'elle inclue les résultats sur 9 échantillons.

En revanche, aucune corrélation n'est observée pour les échantillons sains lorsque nous comparons les résultats obtenus par les deux technologies. Les DII des échantillons de CPm ont été calculés par le même ratio, ce qui ne justifie donc pas l'absence de corrélation pour les échantillons de sujets sains.

Le premier pic correspond aux petits fragments, qui migrent en premier lors de l'arrêt de la force électrique appliquée, en raison de leur faible poids moléculaire. Il peut alors être difficile de détecter les très petits fragments (<100pb) qui migrent ensemble et rapidement. Or la quantité des petits ADNs (< 100 bp) dans l'échantillon peut influencer la taille du 1^{er} pic, la concentration mesurée, et ainsi modifier le DII obtenu. Il faudrait pouvoir ajuster la vitesse de migration. Des optimisations sont en cours, notamment par un pallier de pression faible exercé sur au départ de la migration des fragments.

Nous n'observons pas de corrélation entre les concentrations obtenues par la PCR digitale en gouttelettes (avec un amplicon de 60 bp) et le système BIABooster. Pour les échantillons CPm, une corrélation est observée ($r^2 = 0.96$), mais pas pour les échantillons mCRC et ni pour les échantillons de sujets sains. Le BIABooster mène à une concentration à peu près 20 fois plus grande que la dPCR 60 bp.

Le BIABooster donne un résultat de détection de l'ADN double brin, alors que la PCR digitale en gouttelettes quantifie, par estimation, l'ADN amplifiable. Cela pourrait modifier le résultat de la lecture de fluorescence. En particulier, la quantité d'ADN mesurée par PCR digitale en gouttelettes pourrait alors être inférieure à la mesure de l'ADN total (amplifiable et non amplifiable) par BIABooster.

A.II.3.4. Conclusion

Les analyses par le système BIABooster suggèrent une différence d'environ 10 pb entre les profils de tailles d'ADN circulant de patients atteints de cancer, en regard des sujets sains.

Ce décalage de taille est cohérent avec les résultats publiés récemment par Underhill *et al.*³¹⁹. En revanche, ces derniers ont décrit une différence de 30 pb environ entre l'ADN circulant de patients et celui de sujets sains. Il faudrait préciser ce décalage de taille de l'ADN circulant, et évaluer l'ADNtc de plusieurs types de cancers, afin de valider nos observations.

Il serait nécessaire de valider nos résultats par l'analyse d'échantillons supplémentaires, de patients et de sujets sains, dans des conditions de collecte et de stockage identiques. Cela permettrait de s'affranchir de tout biais dû à ces considérations pré-analytiques, qui pourraient influencer la fragmentation de l'ADN circulant.

Afin de déterminer si l'ADNtc, provenant de la tumeur, est la cause de ce décalage du 1^{er} pic de taille des fragments, il serait envisageable d'étendre la technique à une séparation des ADN issus des pics respectifs. Il serait alors possible d'analyser la quantité d'ADN muté circulant correspondant aux plus petits fragments. Dans le cas où la portion d'ADNtc sous le 1^{er} pic serait plus élevée que dans le second, cela apporterait une confirmation que l'ADNtc est plus fragmenté que l'ADN provenant de cellules normales ou du microenvironnement tumoral.

L'approche par le système BIABooster, si elle s'avère pertinente, serait attractive pour une application diagnostique, en raison de la détection « directe » de l'ADN, sans étape de préamplification (limitant le risque de contamination), du coût modéré et de la rapidité des analyses. De plus, ce système, vise, à terme, de permettre une détection de l'ADN directement à partir du plasma.

					Propor	tion de fras	illes (pb):	1	
Pathologie	Echantillon	Réf.	Taille du 1er pic (pb)	Taille du 2ème pic (pb)	75-240	240-370	370-580	580-2000	Concentration (pg/µL)
	14PL1	2	150	296	31%	21%	6%	43%	121
	26PL1	4	131	270	75%	19%	3%	3%	3200
	74PL1	8	139	282	64%	21%	9%	6%	330
CCR	114PL1	11	138	260	68%	24%	6%	2%	1700
CCRM	66PL2	-	141	292	74%	18%	4%	4%	1520
	67PL1	-	140	278	47%	42%	8%	3%	720
	18PL1	-	145	319	12%	31%	37%	20%	1620
	63PL1	-	147	293	29%	36%	28%	7%	4100
moy. mCRC			141,4	286,25	50,00%	26,50%	12,63%	11,00%	1663,88
écart-type			5,9	18,07	23,83%	8,83%	12,65%	14,16%	1381,97
	12PL5	22	133	214	43%	33%	14%	14%	140
	97PL1	15	151	301	50%	25%	12.5%	12.5%	160
	68PL1	17	137	2 9 4	71%	14%	4%	11%	2380
	48PL5	20	145	290	63%	23%	7%	7%	600
CPm	48PL7	25	142	287	68%	24%	5%	3%	760
	39PL2	19	149	295	47%	29%	12%	12%	340
	56PL1	16	138	287	75%	13%	1%	11%	1420
	59PL1	14	153	307	50%	27%	9%	14%	440
	50PL1	18	157	306	44%	25%	19%	13%	320
moy. CPm		-	145.0	287	56.78%	23,67%	8,88%	10.63%	728,9
écart-type		-	8.1	28.3	12,45%	6,50%	6,25%	5.03%	732,6
moy, cancer	1 1		143,3	286,5	0,5	0.3	0.1	0.1	1168,9
écart-type	1 1		7,2	23.3	0,2	0.1	0.1	0,1	1155,6
	F'2	27	151	304	47%	18%	11%	22%	280
	M'2	-	150	287	-	-	-	-	-
	M'3	28	141	289	73%	20%	4%	4%	860
	M'5	29	156	304	53%	24%	12%	12%	340
	M'6	30	147	292	62%	24%	10%	5%	420
	F'1	31	151	299	46%	27%	9%	18%	220
Sujets sains	MNS01	32	148	290	40%	20%	20%	20%	100
	M04	33	152	304	47%	27%	13%	13%	300
	M03	34	152	304	33%	33%	17%	17%	120
	F'3	35	157	317	24%	30%	30%	16%	600
	F18	36	152	299	41%	29%	22%	8%	1720
	FNS03	-	160	308	34%	30%	26%	11%	940
	M'4	-	135.00	284.00	-	-	-	-	-
	F'4	-	140.00	288.00	-	-	-	-	-
	F'5	-	142.00	291.00	-	-	-	-	-
mov. Sains			148.9	297.3	45.45%	25,64%	15.82%	13.27%	536.36
écart-type			6.9	9,4	18.55%	8.72%	8.83%	6.85%	483.73
	<u> </u>		,.	-,.	10,0070		9,00.0		

"-" pas de donnée en PCR digitale en gouttelettes

Tableau 7. Résultats d'analyse des profils d'ADN circulant plasmatique de patients CCRm, CPm et de sujets sains mesurés par la technique BIABooster. Les 1er (75-20pb) et 2ème pics (240-370 pb) de taille d'ADN observés sont indiqués, ainsi que les proportions de ces pics en comparaison aux 4 pics mesurés.

A.II.4. DISCUSSION DE LA PARTIE A.II.

1) Importance du choix des patients dans l'analyse de l'intégrité de l'ADNtc

Notre étude préliminaire présente une limitation principale qui est le nombre faible de patients. L'utilisation d'un plus grand nombre d'échantillons permettrait de confirmer la taille plus petite des fragments d'ADNtc. En effet, il aurait été utile de distinguer les patients dont le pourcentage d'ADNtc (identifié par exemple par la présence de mutation(s)) est élevé voire très élevé (plus de 50% par exemple, ce qui suggèrerait 100% d'ADN d'origine tumoral dans le cas d'une mutation hétérozygote). Nous aurions ainsi pu déterminer le DII chez ces patients en comparaison aux patients présentant un pourcentage plus faible d'ADN muté circulant et/ou aux patients ne présentant pas d'ADNtc, ce qui aurait permis de caractériser la fragmentation de l'ADNtc spécifiquement.

Une autre limitation est le nombre restreint de prélèvements avant traitement chez les patients atteints de cancer du poumon. Dans notre étude, aucune différence significative n'est observée entre les DII selon que l'on considère les prélèvements avant ou après initiation du traitement (voir « Supplemental Figure 5 » de l'article en préparation en **A.II.1**). Il est cependant envisageable que, selon le traitement, la fragmentation et donc le DII soient influencés par la chimiothérapie, qui pourrait génèrer une lyse massive des cellules. Il faudrait donc envisager une étude, dans laquelle des prélèvements avant traitement seraient analysés dans un premier temps, et avec un nombre de patients supérieurs.

2) Paramètres analytiques de l'étude de l'intégrité de l'ADNtc

Influence potentielle des manipulations pré-analytiques sur l'analyse de l'intégrité de l'ADN circulant

Le processus d'extraction de l'ADN peut induire des variations du taux d'ADN obtenu. Notamment, les kits d'extraction sont plus ou moins efficaces pour la purification des petits fragments. Huggett et al. ont évalué l'efficacité et la linéarité du rendement de l'extraction de différents kits, la présence d'inhibiteurs et le biais potentiel associé à la taille des fragments³²³. Pour cela, les auteurs ont utilisé des mélanges contenant des proportions variables de petits (100 pb), moyens (500 pb) et larges (1500 pb) fragments d'ADN. Les résultats démontraient que le meilleur rendement d'extraction était obtenu pour les fragments de taille intermédiaire tandis que les fragments petits étaient extraits avec une efficacité inférieure. Ainsi, cibler spécifiquement la taille des fragments circulants présente des implications pré-analytiques. Des tests précis et sensibles de quantification de fragments courts pourraient permettre d'évaluer le rendement d'une extraction et l'efficacité des kits utilisés et ainsi déterminer la meilleure stratégie d'extraction d'ADN pour ces échantillons.

Il est à noter qu'en plus de l'étape d'extraction, le stockage, la centrifugation et les autres étapes pré-analytiques sont susceptibles de modifier l'intégrité de l'ADN circulant. Dès lors que les procédés suivis par les fournisseurs ou laboratoires d'analyse diffèrent, un biais peut être introduit, ce qui rend complexe l'analyse de l'intégrité d'échantillons collectés. Il est donc requis de tester différentes conditions pré-analytiques et d'évaluer leur impact sur la qualité des résultats obtenus. Une fois l'ensemble de ces paramètres évalués et optimisés, la fiabilité de la comparaison entre les différentes études (et en particulier entre les échantillons de patients et de sujets sains) sera renforcée.

La PCR digitale en gouttelettes permet d'augmenter le seuil de tolérance aux inhibiteurs purifiés au cours de l'extraction en même temps que les ADN (par exemple : SDS, EDTA et héparine). Cela permet d'augmenter l'efficacité et la reproductibilité de la réaction de PCR²⁶³.

Importance de la conception de tests de ciblage spécifiques de l'ADNtc

Nous avons vu, dans la partie introductive, qu'il existe plusieurs techniques d'évaluation de l'intégrité de l'ADN circulant. La quantification des séquences non codantes ALU/LINE1 répétées dans le génome a principalement été utilisée¹⁹³. Plus récemment, la détection des fragments mutés circulants a été appliquée, tout en faisant varier la taille des amplicons générés, par exemple dans le système IntPlex développé par Moulière *et al.*³¹⁸.

Jusque récemment, peu d'études s'étaient concentrées sur l'évaluation structurale de l'ADN circulant, paramètre clef pour une quantification sensible et précise. La taille des fragments peut influer sur l'amplification de l'ADN, d'où l'importance de modèles comme celui développé dans le chapitre **A.II**. La stabilité de la charge mutationnelle (ratio du nombre de séquences mutées sur le nombre de séquences normales) entre les tests ciblant des tailles d'amplicons différentes démontre qu'il n'y a pas d'amplification préférentielle de petits fragments. Ainsi, dès lors que la concentration en petits fragments amplifiable (60 pb) est supérieure aux fragments plus grands (140 ou 164 pb), il semble que les fragments d'ADNtc amplifiables soient plus petits que 140-160 pb. Ceci suggère l'importance de combiner la détection de l'ADN spécifique de la tumeur à la conception de tests adaptés à la taille des fragments circulants.

Une différence a été observée entre les DII de l'ADN mutant et non mutant calculés par le ratio 302/60, suggérant que l'ADN tumoral est plus fragmenté. En revanche, de l'ADN normal peut provenir de la tumeur. Les cellules tumorales en processus de mort par apoptose ou nécrose libèrent l'ADN dans la circulation sanguine. Les cellules du microenvironnement sont impactées par les traitements ciblant les cellules se divisant de façon fréquente. Dans les échantillons de plasma se retrouvent ainsi les ADN de la tumeur, mutés et non mutés, et les ADN provenant de cellules normales. Il serait d'intérêt de pouvoir différencier l'ADN normal provenant de la tumeur de l'ADN provenant des autres cellules.

Pour mieux comprendre le mécanisme de libération de l'ADN tumoral dans la circulation sanguine, comme mentionné plus haut, il serait pertinent de différencier les patients selon le pourcentage de mutation observé. Cette sous-sélection des patients permettrait de préciser l'origine tumorale des fragments circulants et d'évaluer spécifiquement la taille de ces fragments.

Importance du choix des contrôles dans l'analyse de l'intégrité de l'ADNtc

Dans le cas de la détermination de la concentration en ADN normal dans des échantillons plasmatiques de sujets sains, des résultats parfois différents ont été selon que le test ciblait une séquence KRAS ou EGFR (**A.II.1., Tables 7 et 8**). Cependant on observe pour la quantification des séquences de 60 pb, une concentration moyenne de 16.4 ng/mL avec le test EGFR et 14.81 ng/mL avec le test KRAS. Cette différence, évaluée par un t-test n'est pas significative (ce qui confirme qu'il n'y a pas d'influence de l'efficacité de PCR).

Chez des patients atteints de cancer, il ne serait pas étonnant d'observer une variation du nombre de copies de gènes impliqués dans le cancer. Cela ne devrait en revanche pas être observé

chez des sujets sains, dès lors qu'aucune altération de ces gènes ne devrait être présente. Le choix de la séquence cible est donc primordial en termes de quantification et de conception du test.

Une optimisation de notre méthode de mesure de l'intégrité de l'ADNtc pourrait consister en l'ajout d'un test tel que celui développé dans Didelot *et al.*²⁸⁸. Dans leur étude, les auteurs ont en effet développé un test ciblant 4 gènes situés sur des chromosomes différents et constants dans le génome d'un individu normal. Cibler une séquence non altérée dans le génome tumoral pourrait être pertinent. Cela permettrait en outre de comparer les patients entre eux par la mesure de cette séquence normale, en plus de la mesure de l'altération.

3) Apport des nouvelles approches de caractérisation structurale de l'ADNtc

Sensibilité des techniques Caliper LabChip et BIABooster (Picometrics)

Plusieurs techniques d'analyses de la taille de l'ADN ont été évoquées dans le chapitre II, comprenant le gel d'électrophorèse miniaturisé (Caliper LabChip®, PerkinElmer) et le système BIABooster (Picometrics). Le système Caliper présente une large gamme dynamique d'analyse, avec la détection de fragments dont la taille varie de quelques dizaines de paires de bases à plusieurs milliers de paires de bases. Cela présente un avantage réel pour l'optimisation de conditions de PCR. En revanche, lorsque l'échantillon présentait une quantité faible d'ADN (moins de 1 ng/mL de plasma), rien n'avait pu être détecté. La sensibilité de détection est donc limitée et non adaptée à l'analyse d'ADN faiblement concentré.

Le système BIABooster permet de déterminer le profil de distribution de taille de l'ADN, avec une gamme dynamique allant de 50-70pb à 1500 pb. Bien que cette dernière soit plus restreinte que le système Caliper, il semble qu'elle soit mieux adaptée à la caractérisation de l'ADNtc, qui serait composé de fragments courts. A titre d'exemple, l'analyse d'échantillons non détectables au Caliper (présentant moins d'1 ng d'ADN par mL de plasma) a pu être réalisée efficacement par le système BIABooster. Cette analyse a permis de détecter 2 tailles de fragments majoritaires, que nous appellerons « premier pic » et « deuxième pic », correspondant à des tailles de fragments de 0-240 pb et 240-370 pb respectivement. Par la suite, d'autres échantillons ont été analysés, tel que présenté en **Figures 50 et 51 (A.II.3.)**. Ce système, hautement sensible, a permis de suggérer l'existence d'une différence de profils de taille entre l'ADN plasmatique de sujets sains et celui de patients qui demande à être confirmée par l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons. La comparaison des DII obtenus par PCR digitale en gouttelettes et ceux issus des analyses BIABooster permet de mettre en évidence une corrélation entre les résultats.

Les concentrations évaluées par le BIABooster sont différentes de celles évaluées par PCR digitale (environ 20 fois). Cependant, les concentrations mesurées par BIABooster et par fluorimétrie utilisant le système QuBit (type SyberGreen) sont cohérentes. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que la PCR digitale en gouttelettes quantifie l'ADN amplifiable tandis que le BIABooster et le QuBit, basé sur l'utilisation d'un intercalant fluorogénique, quantifient tous les fragments présents.

En outre, le système BIABooster est basé sur la détection de la fluorescence émise par l'utilisation d'un intercalant fluorogénique. La lecture de fluorescence peut être impactée par la vitesse

de passage des molécules devant le capteur ou encore par la calibration du lecteur de fluorescence (Figure 48, principe de la technique). Ainsi, il est difficile de comparer les concentrations obtenues. A noter que le relâchement du champ électrique entraîne la libération des petits fragments en premier, puis des plus grands, en raison de la force hydrodynamique exercée (**A.II.3., Figure 48A, B**). Les petits fragments migrent assez rapidement, rendant leur détection moins précise. Cela pourrait sousestimer la concentration du premier pic détecté (0-240 pb), aboutissant à des valeurs de DII plus importantes qu'en PCR digitale, et de concentration.

Les résultats semblent prometteurs et suggèrent qu'il serait intéressant de les confirmer par une l'analyse de plus d'échantillons. Il faudrait aussi pouvoir collecter ces échantillons dans les mêmes conditions afin de confirmer la différence que nous avons pu observer entre la taille des ADN de sujets sains et de patients.

Cette technique est très attractive pour l'analyse des fragments tumeur-spécifiques. Suite à l'observation d'une différence de profils d'ADN circulant entre patients et sujets sains, il serait particulièrement pertinent de pouvoir extraire spécifiquement les ADN correspondant au premier pic (ie. 0-240 pb) afin de les différencier du deuxième pic (240-370 pb) (**Figure 50, A.II.3**). Cela permettrait d'analyser la quantité et le ratio d'allèles mutés de tailles correspondant au premier pic et au deuxième, afin de comparer ces ratios à la proportion d'ADN muté dans l'échantillon.

Méthode de séquençage pour l'analyse du profil de distribution en taille de l'ADN circulant

Une technique est en essor pour son application à l'évaluation du profil de distribution en taille des fragments circulants chez les patients atteints de cancer. Il s'agit du séquençage « paired-end ». Cette technique repose sur le séquençage de deux extrémités de fragments courts, inférieurs à 1kb. Cette technologie a été utilisée principalement pour la détection de l'ADN circulant fœtal dans le sang maternel, en vue d'application de diagnostic prénatal^{212,324,325}.

Plus récemment, l'équipe de Jiang, qui a travaillé sur ces applications, s'est intéressée à la distribution en taille de l'ADN circulant chez des patients atteints de carcinome hépato-cellulaire¹³³. Les profils de distribution de tailles d'ADNtc de patients (identifié par une abberation du nombre de copies de régions chromosomiques) et d'ADN circulant de sujets sains ont été comparés. La taille des fragments était déplacée vers une valeur inférieure lorsque la concentration en ADNtc augmentait (aux environs de 166 pb, taille d'un nucléosome) en comparaison aux ADN circulant de sujets sains. En outre, lorsque le pourcentage d'ADNtc augmentait, les auteurs ont observé une diminution de la taille des fragments d'ADNtc, avec l'apparition de petits fragments espacés de dizaines de paires de bases (**Figure 54**).



*Figure 54. Profil de distribution en taille de l'ADNtc observé chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire par Jiang et al.*¹³³. Les pourcentages attribués aux différentes couleurs correspondent à la fréquence d'ADNtc.

Les auteurs ont aussi démontré une corrélation inverse entre la fraction de fragments de taille supérieure à 180 pb et la concentration en ADN circulant chez les patients. En parallèle, les auteurs ont observé une corrélation positive entre la fraction de fragments de taille inférieure à 150 pb et la concentration en fragments circulants. Ces données suggèrent que l'ADN provenant de la tumeur est très fragmenté.

Une autre étude, publiée très récemment, a porté sur l'analyse de la taille des fragments circulants dans un modèle de xénogreffe chez le rat. Le profil de distribution de taille a été réalisé pour l'ADNtc issu de la tumeur (glioblastome) greffée, et pour l'ADN circulant du rat. En outre, une différence de 20-50 pb environ était observée entre les tailles d'ADNtc et d'ADN circulant de rat³¹⁹.

Les auteurs ont ensuite étendu leur analyse au séquençage d'échantillons cliniques de patients atteints de mélanome ou de cancer du poumon. Un décalage de taille, tel que celui observé dans le modèle de xénogreffe, était obtenu pour l'ADNtc en comparaison aux échantillons d'ADN issus de sujets sains (**Figure 55A, B**). Une périodicité de 10 pb de la taille des fragments d'ADNtc a pu être observée (**Figure 55A**).



Figure 55. Profils de distribution en taille de l'ADN de patients atteints de cancer du poumon (A) ou de mélanome (B) déterminés par l'analyse en séquençage paired-end dans l'étude de Underhill et al.³¹⁹.

Etant donné la présence de fragments provenant de cellules non malignes et de cellules tumorales, les auteurs ont procédé à une séparation par migration sur gel d'agarose pour obtenir les fragments de différentes tailles, et ont analysé les fractions mutées dans ces différents fragments. Ils ont utilisé la PCR digitale en gouttelettes (RainDance Technologies[™]) pour déterminer le ratio d'ADN muté correspondant aux fragments de plus petites tailles (sous le pic majoritaire). Les fragments les plus courts correspondaient à des charges mutationnelles plus élevées, avec un décalage de 20 à 50 pb pour les plus importantes fractions d'ADNtc. Cette récente étude démontre que l'ADNtc est plus petit que l'ADN libre circulant non issu de cellules tumorales. La taille d'ADNtc observée dans ces études et dans nos travaux (160-180 pb) pourrait suggérer un mécanisme de fragmentation de l'ADNtc par un processus apoptotique.

Discussion sur l'apport des approches utilisées pour l'évaluation du profil de distribution en taille de l'ADNtc

Dans le but de porter l'intégrité de l'ADNtc vers le développement d'un biomarqueur clinique, de nombreuses optimisations sont à réaliser. Les analyses basées sur le séquençage, décrites plus haut, soient très informatives sur la structure de l'ADNtc. Cependant, elles requièrent une connaissance accrue de la bio-informatique et devraient être normalisées notamment pour la méthodologie d'analyse des résultats afin de pouvoir les comparer entre elles.

Le protocole suivi pour la préparation des librairies de séquençage peut varier, notamment concernant la quantité d'ADN utilisée pour générer les librairies. En particulier, dans l'article de Underhill et al.³¹⁹, dans le cas du mélanome 100 ng étaient préconisés tandis que 10 ng étaient requis pour les échantillons de poumon, d'après les recommandations du fournisseur (Illumina). Il est à noter que les analyses réalisées par les auteurs en PCR digitale portaient sur de l'ADN des librairies, donc enrichis et ayant potentiellement subi des modifications relatives au biais de l'amplification PCR. Il serait donc d'intérêt, en particulier dans le cas de l'étude de l'intégrité de l'ADN circulant, de pouvoir analyser les fragments n'ayant pas été manipulés auparavant.

Notre étude a mis en évidence la technique BIABooster comme une méthode simple d'utilisation et moins coûteuse que les méthodes de séquençage. La sensibilité est très élevée bien que la technique soit limitée en résolution, ne permettant pas d'observer la périodicité (10 pb en dessous de la taille de pic majoritaire) détectée par le séquençage « paired-end ». Les tailles de fragments d'ADN identifiées dans notre étude sont cependant cohérentes avec les travaux d'Underhill et Jiang. En accord avec ces études, nous avons pu observer un décalage entre les tailles d'ADN circulant chez les patients en comparaison aux sujets sains. Le DII (ratio des fragments les plus grands et des plus petits) est significativement différent chez les patients et chez les sujets sains, en accord avec nos résultats de PCR digitale en gouttelettes. S'il devenait possible d'extraire la fraction correspondant aux plus petits fragments, il pourrait être possible de confirmer la taille des fragments d'ADNtc par la quantification des fragments mutés en PCR digitale. Suite à cela, nous pourrions alors envisager le potentiel clinique de l'évaluation de l'intégrité chez les patients.

Ces techniques de « profilage » de l'ADN et les tests optimisés en PCR digitale en gouttelettes pour la détection des fragments d'ADNtc, permettent d'envisager le développement d'un biomarqueur spécifique du cancer, tout en fournissant aux chercheurs les paramètres techniques nécessaires à la détection spécifique et précise de l'ADNtc.

CHAPITRE A.III. VERS UN BIOMARQUEUR UNIVERSEL DU CANCER : ETUDE DE LA METHYLATION DANS LE CANCER COLORECTAL

A.III.1. RESUME DE L'ARTICLE

A.III.1.1. Introduction

Les prélèvements de bio-fluides tels que le plasma ou les urines, représentent un espoir considérable pour la détection non- ou minimalement invasive de biomarqueurs du cancer. Grâce au développement de la PCR digitale en gouttelettes, il est désormais possible de détecter des cibles à une résolution de l'ordre de la molécule unique. De plus en plus, le séquençage de nouvelle génération (NGS) est utilisé pour l'identification d'altérations génomiques dans la tumeur, afin d'orienter le choix de la thérapie. Durant les dernières années, le couplage du NGS, à la détection consécutive de l'ADNtc plasmatique au cours du suivi des patients a été considérablement développé.

Un désagrément de cette stratégie peut être la faible représentativité de clones présents dans l'échantillon analysé, ou encore l'absence d'altération ciblée par les panels commerciaux validés pour le séquençage. De plus, la présence de plusieurs altérations détectées au sein d'un même échantillon de tumeur complique le choix de la mutation pertinente à cibler dans l'ADNtc.

En outre, il n'existe pas nécessairement de test pour un suivi de l'altération identifiée dans la tumeur. Le développement de tests spécifiques, tel que décrit dans le chapitre A.I, peut s'avérer fastidieux et coûteux. Au vu du large éventail de gènes impliqués dans le cancer et de la présence potentielle de plusieurs mutations sur chacun d'eux, des méthodes de séquençage émergent pour pallier au besoin de « large » criblage. Cependant ces méthodes nécessitent une connaissance accrue de la bio-informatique et des découvertes en onco-génétique mutationnelle.

Ainsi, la recherche de biomarqueurs offrant la possibilité de tester une large proportion de patients avec un nombre limité de tests est en pleine émergence. C'est pourquoi l'étude de l'intégrité de l'ADN circulant (voir chapitre précédent, A.II.), ou de l'hyperméthylation de l'ADN est attractive.

A.III.1.2. Objectifs de l'étude

L'hyperméthylation de gènes spécifiques ayant été décrite comme un marqueur précoce du cancer colorectal, cette étude vise à déterminer son potentiel comme marqueur circulant. Disposer d'un test de détection de l'ADNtc dit « universel », ne requérant pas de connaissance *a priori* du profil mutationnel du patient, présente un intérêt dans la recherche de marqueurs du cancer. En particulier, un objectif est de déterminer si ce marqueur peut permettre de cibler une grande partie de patients. Cela permettrait de développer un test « universel » qui soit applicable pour le suivi d'une proportion importante de patients.

A.III.1.3. Méthode

Des tests de ciblage de l'hyperméthylation des gènes *WIF1*, *PENK* et *NPY* ont été développés en PCR digitale en gouttelettes. Le ciblage d'un gène référence (albumine) valide la bonne réalisation du test dans le cas d'échantillons négatifs et permet de déterminer un pourcentage d'hyperméthylation.

La sensibilité et la spécificité des tests de PCR digitale en gouttelettes ont été caractérisées (calcul de limite de blanc (LOB) et de détection (LOD)).

Les ADN extraits de tissus tumoraux et de tissus adjacents correspondants (N=22) ont été testés pour l'hyperméthylation de *WIF1*, *PENK* et *NPY*. L'analyse de 56 autres échantillons de tumeurs (stades I-IV) a ensuite été réalisée pour confirmer les résultats observés.

Des ADN de tumeur et de plasma correspondant (avant traitement) (N=20 stades IV ; N=21 stade I-IIII) ont été analysés afin de déterminer la sensibilité de l'hyperméthylation de *WIF1*, *PENK* et *NPY* comme marqueur circulant du cancer.

Le suivi de l'ADN hyperméthylé en comparaison au suivi de l'ADN muté a été réalisé chez 9 patients.

A.III.1.4. Principaux résultats et conclusion

Des tests de l'hyperméthylation des gènes *WIF1, PENK* et *NPY* ont été mis au point en PCR digitale en gouttelettes et présentaient des limites de blanc de 7, 9 et 6, resctivement. Etant donné la limite de blanc plus élevée du test ciblant le gène *PENK*, les deux autres cibles ont été analysées dans les échantillons. La limite de détection de ces tests atteignait 0.1%.

L'hyperméthylation des gènes *WIF1* et *NPY* était significativement plus élevée dans les tissus tumoraux en comparaison aux tissus normaux adjacents indépendamment du stade d'avancement du cancer (I-IV) (p<0.0001). Ce résultat suggère la spécificité du test de l'hyperméthylation, qui pourrait être applicable aux patients atteints de cancer colorectal de tous stades.

Tous les ADN extraits de tumeurs présentaient une hyperméthylation d'au moins un des deux marqueurs *NPY* ou *WIF1*, et 94.3% des patients présentaient une hyperméthylation de ces deux gènes. A noter qu'il n'y avait pas de différence signicative entre les pourcentages d'hyperméthylation observés selon le stade du cancer.

Suite à ces résultats dans l'ADN extrait de tumeur, l'objectif était d'évaluer la faisabilité de la détection d'hyperméthylation de l'ADNtc. L'ADN plasmatique de patients, dont la tumeur présentait un certain pourcentage de mutation, a été analysé par le test d'hyperméthylation de *WIF1* et *NPY*. La mutation identifiée dans la tumeur a été retrouvée dans l'ADN plasmatique dans 80% des cas de cancers de stade IV et 45% des cas de cancers de stades I-III. Dans les cas où la mutation était détectable, une corrélation entre les pourcentages de mutation et d'hyperméthylation était observée (r²=0.69, p=0.001). Un tel résultat suggère la possibilité du suivi de l'évolution tumorale via la détection des cibles *NPY* ou *WIF1* hyperméthylées.

A.III.1.4. Conclusion

L'hyperméthylation des gènes *NPY* et *WIF1* identifiée dans la tumeur est un marqueur spécifique du cancer colorectal, tous stades confondus. Ainsi, l'ADN circulant hyperméthylé représente un marqueur potentiel pour le suivi de patients atteints de cancer colorectal. Une forte corrélation entre l'ADN muté et l'ADN hyperméthylé circulant suggère la faisabilité du suivi de l'ADN circulant hyperméthylé en alternative à la détermination du statut mutationnel.

L'évaluation de l'hyperméthylation permet la détection de l'ADNtc chez un nombre élevé de patients qui présentaient des mutations différentes (*KRAS, BRAF, NRAS, TP53, PIK3CA*), avec seulement deux tests. Un tel marqueur pourrait simplifier la détection d'ADNtc, limiter les coûts d'analyse, en plus d'être potentiellement précoce, étant donné son occurrence précoce dans la cancérogenèse. La détection de l'hyperméthylation de l'ADNtc est donc un marqueur attractif pour une application clinique.

A.III.2. ARTICLE

"A Study of Hypermethylated Circulating Tumor DNA as a Universal Colorectal Cancer Biomarker"

Sonia Garrigou,^{1†} Geraldine Perkins,^{1,2†} Fanny Garlan,¹ Corinne Normand,¹ Audrey Didelot,¹ Delphine Le Corre,¹ Sanam Peyvandi,³ Claire Mulot,^{1,4} Ralph Niarra,⁵ Pascaline Aucouturier,⁵ Gilles Chatellier,⁵ Philippe Nizard,¹ Karla Perez-Toralla,¹ Eleonora Zonta,¹ Cecile Charpy,³ Anais Pujals,⁶ Caroline Barau,⁷ Olivier Bouché,⁸ Jean-François Emile,⁹ Denis Pezet,¹⁰ Frederic Bibeau,¹¹ J. Brian Hutchison,¹² Darren R. Link,¹² Aziz Zaanan,^{1,2} Pierre Laurent-Puig,^{1,13*} Iradj Sobhani,^{3*} and Valerie Taly^{1*}

BACKGROUND: Circulating tumor DNA (ctDNA) has emerged as a good candidate for tracking tumor dynamics in different cancer types, potentially avoiding repeated tumor biopsies. Many different genes can be mutated within a tumor, complicating procedures for tumor monitoring, even with highly sensitive next-generation sequencing (NGS) strategies. Droplet-based digital PCR (dPCR) is a highly sensitive and quantitative procedure, allowing detection of very low amounts of circulating tumor genetic material, but can be limited in the total number of target loci monitored.

METHODS: We analyzed hypermethylation of 3 genes, by use of droplet-based dPCR in different stages of colorectal cancer (CRC), to identify universal markers for tumor follow-up.

RESULTS: Hypermethylation of *WIF1* (WNT inhibitory factor 1) and *NPY* (neuropeptide Y) genes was significantly higher in tumor tissue compared to normal tissue, independently of tumor stage. All tumor tissues appeared positive for one of the 2 markers. Methylated ctDNA (MetctDNA) was detected in 80% of metastatic CRC and 45% of localized CRC. For samples with detectable mutations in ctDNA, MetctDNA and mutant ctDNA (MutctDNA) fractions were correlated. During follow-up of different stage CRC

¹ Université Paris Sorbonne Cité, INSERM UMR-S1147, CNRS SNC5014, Centre Universitaire des Saints-Pères, Paris Cedex 06, France. Equipe labélisée Ligue contre le cancer; ² Department of Digestive Oncology, AP-HP, European Georges Pompidou Hospital, Paris Descartes University, Paris, France; ³ Department of Gastroenterology, Henri-Mondor Hospital-APHP and EA 7375-EC2M3 Laboratory, University of Paris Est Creteil Val de Marne, Creteil, France; ⁴ CRB Epigenetec, INSERM UMR-S1147, Centre Universitaire des Saints-Pères, Paris Cedex 06, France; ⁵ CIC-EC4 URC HEGP, AP-HP, Hôpitaux Universitaires Paris Ouest, Paris, France; ⁶ INSERM U955, University of Paris Est Creteil Val de Marne and Department of Pathology, AP-HP, Henri-Mondor Hospital, Créteil, France; ⁷ CRB, AP-HP, Henri-Mondor Hospital, Créteil, France; ⁸ Sevice d'hépatogastroentérologie et de cancérologie digestive, CHU de Reims, Hôpital Robert-Dehré, Reims Cedex, France; ⁹ Department of Pathology, Hôpital Ambroise Paré, AP-HP, Université de Versailles St Quentin en Yvelines, Boulogne-Billancourt, France; ¹⁰ CHU Clermont Ferrand, Clermont Ferrand Cedex 1, France; ¹¹ Service d'Anatomo-Pathologie, Centre Val d'Aurelle Paul-Lamarque, Montpellier, France; ¹² RainDance Technologies, Billerica, MA; ¹³ Department of Biology, European Georges Pompidou Hospital, AP-HP, Paris Descartes University, Paris, France. patients, MetctDNA changes allowed monitoring of tumor evolution.

CONCLUSIONS: These results indicate that MetctDNA could be used as a universal surrogate marker for tumor follow-up in CRC patients, and monitoring MetctDNA by droplet-based dPCR could avoid the need for monitoring mutations.

© 2016 American Association for Clinical Chemistry

The ability to perform noninvasive dynamic monitoring of tumors has long been a challenge for clinicians. A rapidly growing body of work has raised the prospect of performing serial analyses of circulating tumor DNA $(ctDNA)^{14}$ in body fluids (1), and this approach is now being explored as a potential marker of cancer evolution (2). Technologic advances have facilitated the development of methods for highly sensitive and quantitative detection of ctDNA, including microfluidic dropletbased digital PCR (dPCR) (3, 4) and optimized nextgeneration sequencing (NGS) strategies (5-7). Building on previous bulk dPCR strategies (8), droplet-based dPCR uses millions of water-in-oil droplets for parallel amplification of millions of individual DNA fragments (9, 10) leading to highly sensitive mutation detection (11-14). This method is truly quantitative and highly

 † Sonia Garrigou and Geraldine Perkins contributed equally to the work, and both should be considered as first authors.

* Address correspondence to: V.T. at Université Sorbonne Paris Cité, INSERM UMRS1147, CNRS SNC5014, 45 rue des Saints Pères, F-75270 Paris, France. E-mail valerie.taly@parisdescartes.fr. P.L.-P. at Université Sorbonne Paris Cité, INSERM UMRS1147, CNRS SNC5014, 45 rue des Saints Pères, F-75270 Paris, France. E-mail pierre.laurentpuig@parisdescartes.fr. I.S. at Université Sorbonne Paris Cité, INSERM UMRS1147, CNRS SNC5014, 45 rue des Saints Pères, F-75270 Paris, France. E-mail iradj.sobhani@hmn.aphp.fr.

Received January 8, 2016; accepted April 28, 2016.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2015.253609

© 2016 American Association for Clinical Chemistry

¹⁴ Nonstandard abbreviations: ctDNA, circulating tumor DNA; dPCR, digital PCR; NGS, next-generation sequencing; qPCR, quantitative PCR; CRC, colorectal cancer; MetctDNA, methylated circulating tumor DNA; MutctDNA, mutant circulating tumor DNA; LOB, limit of blank; EGFR, epidermal growth factor receptor; LOD, limit of detection; mCRC, metastatic colorectal cancer.
precise, allowing finely tuned monitoring of ctDNA levels (3, 15), paving the way for early cancer recurrence detection, identification of resistant subclones as well as early and cost-effective evaluation of treatment efficacy (16-20).

Two strategies generally have been followed for ctDNA analysis by dPCR. The first strategy has relied on the detection of well-known mutations associated with sensitivity or resistance to treatment (and generally part of companion diagnostics tests), whereas, the second strategy has been based on the identification of one specific mutation identified from the patient's tumor DNA to monitor the presence of ctDNA (17). The latter strategy has several drawbacks: first, when using targeted sequencing, all tumors do not present well-represented mutant allele(s) that can be easily tracked to follow disease evolution and, second, even when a mutated allele is detected, there may not be readily available assays for its detection. Moreover, although tumor-specific mutations represent highly specific cancer markers, the sheer number of potentially mutated genes as well as the many different base positions that can be mutated for the same gene have compromised the utility (21) and the costeffectiveness of this approach. Highly sensitive NGS strategies that address some of these challenges have been described, but still require cumbersome and hands-on procedures to be successfully implemented in the laboratory. Consequently, new biomarkers are being investigated for screening a large fraction, if not all, cancer patients. Among these markers, a large focus has been placed on the analysis of circulating DNA integrity (22-24), dysregulation of microRNA expression (25), and DNA hypermethylation (26).

DNA hypermethylation in the regulatory regions of specific genes has been described as a potential early cancer marker with strategies for diagnostic or cancer screening procedures being developed (27). Most methods developed for DNA methylation analysis have used conventional quantitative PCR (qPCR) strategies with a few reports describing the use of droplet-based digital approaches for this purpose (21, 28, 29).

Here, we have explored whether universal markers for colon cancer follow-up could be developed by combining the simplicity of picoliter droplet-based dPCR and pertinent hypermethylated sequence monitoring. In addition, we considered whether monitoring ctDNA evolution through the analysis of such markers could provide a surrogate for the follow-up of tumor-specific mutations.

Materials and Methods

STUDY DESIGN

itory factor 1)¹⁵, NPY (neuropeptide Y), and PENK (proenkephalin), using droplet-based dPCR technology. The workflow of the study is described in Fig. 1. Four prospective cohorts of patients presenting a CRC were included, with a total of 70 metastatic CRC patients and 78 localized CRC patients, with 240 samples. First, methylation was evaluated in tumor samples of 56 patients, for either comparison with healthy tissue, or for correlation with tumor stage. Secondly, plasma samples from 127 patients were analyzed for the presence of methylated ctDNA (MetctDNA). Comparison was done between the detection of methylation in tumor tissue and plasma for 41 patients. Data were available for 53 patients for analysis and comparison of fractions of mutant ctDNA (MutctDNA) and MetctDNA. Nine patients were selected for MutctDNA and MetctDNA comparison for the follow-up. The samples presenting a low fraction of targeted allele(s) or ambiguous results [i.e., presenting droplet cluster with very low amounts of droplets close to the limit of blank (LOB) or nonclustered population of droplets] were submitted to the appropriate duplex assay(s) to confirm the presence of the targeted allele(s).

SAMPLE COLLECTION AND DNA PREPARATION

Patients and healthy study participants. Two hundred and forty CRC samples were selected from 4 cohorts of patients (n = 148 patients) and pooled for this study. Among these 148 patients, 63 had a metastatic CRC among which 20 of them proceed from the CETRAS study and 43 from the PLACOL study both approved by the Ile-de-France ethics committee number 2 (CPP Ilede-France 2 2007-03-01-RCB 2007-A00124-49, AFSSAPS A70310-31 for the CETRAS study and ID CRB: 2013-A00680-45 for the PLACOL study). The CETRAS study included mCRC patients treated with anti-EGFR (epidermal growth factor receptor) therapy. For the 20 CETRAS patients, primitive tumor DNA was analyzed as well as plasma DNA obtained at progression of metastatic disease and before the start of the anti-EGFR therapy. The PLACOL study included mCRC patients treated with chemotherapy. For the 43 PLACOL, primitive tumor samples were available as well as plasma samples drawn at inclusion and before each chemotherapy treatment (3 patients, 22 samples excluding the first sample at inclusion). For these patients, 33 were selected at the start of their first line of chemother-

The main goal of this study was to explore the presence of methylated DNA in colorectal cancer (CRC) patients' tumors and plasma, with 3 markers: *WIF1* (WNT inhib-

¹⁵ Human genes: WIF1, WNT inhibitory factor 1; NPY, neuropeptide Y; PENK, proenkephalin; ALB, albumin; KRAS, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; BRAF, B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase; TP53, tumor protein p53; PIK3CA phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; NRAS, neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog; APC, adenomatous polyposis coli.



patients) were analyzed to understand the specificity of the markers for tumor tissues. Thirty-four additional frozen tumor tissues were analyzed and results of these 56 cancer tissues compiled to analyze the prevalence of methylated DNA in tumor tissues in function of tumor stage. For 41 of these patients*, plasma samples were analyzed for the presence of MetctDNA (B). Plasma samples of additional 85 patients were analyzed for the presence of MetctDNA (B). For 53 of these patients, we compared the detected fraction of MetctDNA and MutctDNA. For 22 patients, we both analyzed plasma samples collected before and after surgery (5–21 days after surgery). Finally, MetctDNA and MutctDNA were compared for the follow-up of 9 patients (**68 samples for MutctDNA and 68 matched samples for MetctDNA). In addition, 46 plasma samples from noncancer patients were also tested (described in online Supplemental Table 4).

apy, 6 at the start of their second line of chemotherapy, 2 at the start of their third line of chemotherapy, 1 at the start of their fourth line of chemotherapy and 1 at the start of their fifth line of chemotherapy. Seventy-four patients were selected from the ALGECOLS protocol also approved by theIle-de-France ethics committee number 2 (NCT01198743), and had a localized CRC. The ALGECOLS study included patients with localized CRC patients. Plasma samples were drawn at the time of surgery and/or 5 days after surgery, then every 3–5 months during follow-up, for up to 3 years. For these patients, primitive tumor DNA was analyzed for 25 patients as well as corresponding healthy tissue DNA for 11 of these patients and plasma DNA was analyzed before surgery (n = 49), 5–21 days after surgery (n = 22 from which 18 were drawn at day 5, 1 at day 6, 1 at day 7, 1 at day 8 and 1 at day 21) and during follow-up (6 patients, 28 samples excluding samples before and after surgery). Finally 11 patients with stage II to IV cancer were included (INSERM, CPP-IDF IX-11–019) (see also (30)). Primitive tumor DNA and corresponding normal tumor DNA were analyzed for these 11 patients. All patients signed an informed consent form. The mean age at inclusion was 65, and the male/female ratio was 1:7.

Fifty-two patients with either localized or metastatic cancer presented a mutation within their tumor tissue for which we had developed a picoliter-droplet dPCR assay. These mutations include the 7 most frequent mutations of the *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) oncogene, KRAS Q61H, KRAS A146T, BRAF V600E, TP53 R175H, TP53 R248Q, TP53 R273C, TP53 R273H, PIK3CA E545K, or NRAS Q61L. Circulating plasma DNA of these patients was tested for the presence of the mutations.

In addition to these patients' samples, plasma samples from 30 healthy individuals were ordered from Biological Specialty Corporation. The mean age was 38 (13) years. The male/female ratio was 2:3. Sixteen controls from the case controls of the Cecile study (noncancer patients, female) were also included (31).

Tumor sample preparation, storage, DNA extraction, and quantification. Tumors were flash frozen in liquid nitrogen immediately after resection until further analysis. Each tumor was reviewed by a pathologist (J.-F. Emile) and the tumor cell content was assessed by hematoxylin-eosin-safran staining. DNA was extracted with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration was measured with a Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher) by use of the dsDNA BR Assay (Invitrogen). Extracted DNA samples were stored frozen at -20 °C before testing.

Plasma sample preparation, storage, DNA extraction, and quantification. Blood samples were collected in EDTA tubes. Plasma samples were immediately separated from the cellular fraction by centrifugation at 3000g (4 °C) and stored frozen at -80 °C before DNA extraction. Plasma samples of healthy volunteers (see above) were received in dry ice, aliquoted and immediately frozen at -80 °C before DNA extraction. Before extraction, plasma samples were centrifuged for 10 min at 3000g. Plasma DNA was extracted using the QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) from 2 mL of sample according to the manufacturer's instructions. The quantity of DNA was measured by Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, Life Technologies) using the dsDNA HS Assay (Invitrogen). Extracted DNA samples were stored frozen at -20 °C before testing.

Genomic DNA preparation. Universal hypermethylated DNA was purchased from Zymo research and normal genomic DNA from Promega. These DNAs were used as controls and both fragmented to an average size of 600–800 pb using the S2 Focused-Ultrasonicator (Covaris), according to manufacturer's recommended protocol. DNA concentration was determined using the Qubit 2.0 fluorometer using the dsDNA BR Assay Kit.

Hypermethylated universal control DNA was serially diluted and mixed with human normal genomic DNA to test the lower limit of hypermethylated DNA detection with the developed picoliter droplet-based assays. Human genomic DNA was also used as negative control to calculate the LOB and limit of detection (LOD) of the assay.

Bisulfite conversion. DNA extracted was modified by bisulfite, using the EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research). In brief, bisulfite reaction was carried out in a thermocycler at 98 °C for 10 min and 53 °C for 4 h. The cleanup of bisulfite-converted DNA followed the recommendations of the manufacturer, and converted DNA was eluted in M-Elution Buffer and stored at -20 °C.

NGS, PICOLITER DROPLET-dPCR, DATA ANALYSIS, AND STATISTICAL ANALYSIS

For a description see the Supplemental materials provided in the Data Supplement that accompanies the online version of this article at http://www.clinchem.org/ content/vol62/issue8.

Results

MULTIPLEX dPCR TO DETECT SPECIFIC DNA HYPERMETHYLATED SEQUENCES

Aberrant methylation of NPY, PENK, and WIF1 promoter regions has been described in CRC tissues in comparison with healthy tissues and proposed as a promising marker for blood- or stool-based diagnosis (30). We developed a 2-panel assay targeting these markers with albumin sequence (ALB) as a reference (Fig. 2 and online Supplemental Table 1). The LOB and LOD determination are described in the Materials and Methods sections. The dynamic range and sensitivity of the assays were determined as described previously (32-34). The measured concentration of hypermethylated DNA matched the anticipated concentration from 10% to 0.1% (see online Supplemental Fig. 1). A higher false positive rate was observed for PENK marker (see online Supplemental Fig. 2). In the following text, only WIF1 and NPY markers' results will be presented.

PICOLITER DROPLET-BASED PCR ANALYSIS OF TUMOR TISSUE SAMPLES WITH DIFFERENT STAGE DISEASES

Hypermethylation of the targeted sequences was assessed in a set of 22 paired tumor and adjacent normal frozen tissue samples (Fig. 2, B and C). When analyzing the frequency of hypermethylated alleles (Fig. 3, A and B, and online Supplemental Table 2), tumor tissues appeared significantly different from normal tissues (*P* values <0.0001, paired nonparametric Wilcoxon test). To confirm the prevalence of these markers in CRC, additional tumors were analyzed. In total, 56 stage I to IV CRC samples were analyzed (see online Supplemental Tables 2 and 3). All samples appeared positive for *WIF1* and/or *NPY* markers (94.3% were positive for both markers) with a good correlation between the observed





Schematic representation of assay workflow. An aqueous phase containing TaqMan® assay reagents and genomic DNA is emulsified. Probes specific for the different sequences are present. A 2-panel assay has been developed. The first panel targets methylated *WIF1* and unmethylated *ALB* sequences (3a) when the second panel targets methylated *PENK* and *NPY* sequences (3b). After thermal cycling, the endpoint fluorescence of each target containing droplet is measured, allowing the identification of the target sequences. (B and C), 2-dimensional histogram of the 2-panel assay for the analysis of DNA extracted from tumor tissue (B) or an unmethylated healthy tissue (C). DNA extracted from tumor tissue or adjacent healthy tissue was encapsulated in droplets and submitted to the procedure described in Panel A. 6-FAM, 6-carboxyfluorescein; AU, arbitrary units; VIC, a proprietary dye of Applied Biosystems/Life Technologies.



methylated marker fractions in the tested samples (see online Supplemental Fig. 3, D–F). It is noteworthy that 2 samples presented a percentage of *WIF1* methylated DNA higher than 100% meaning that a higher number of *WIF1* sequences were detected as compared to *ALB* sequences. Such results could be due to tumor genetic rearrangement leading to amplification of the targeted sequence. No significant differences were observed either between the tumor stage and the presence or absence of hypermethylated sequences, or between the stage and the fraction of the 3 markers (Kruskal–Wallis nonparametric test) (see online Supplemental Fig. 3, A–C).

PICOLITER DROPLET-BASED PCR ANALYSIS OF MATCHED TUMOR/PLASMA SAMPLES OF PATIENTS WITH DIFFERENT STAGE DISEASES

Among these patients, we analyzed 41 plasma samples from 20 patients with metastatic CRC (mCRC, plasma obtained at treatment progression and before the start of anti-EGFR therapy) and 21 patients with localized CRC (plasma obtained at diagnosis and before surgery) (see online Supplemental Table 3). The ratio of the targeted markers in tumor tissue and plasma was correlated (*NPY/WIF*: $R^2 = 0.69$, P = 0.001). Within the samples described above, 23 samples were selected such as the patient's tumor was bearing a mutation for which a dPCR assay had been developed and validated (see Materials and Methods) and, of these, 18 presented MutctDNA when analyzed by picoliter droplet-based dPCR (34) (average of 12.7% or 1.48% for mCRC or localized cancers patients respectively) (see online Supplemental Table 3). The fractions of MutctDNA and MetctDNA were correlated ($R^2 = 0.87$ and 0.94 for

WIF1 and *NPY* markers, respectively, *P* values <0.0001, Spearman nonparametric test). To ensure specificity of the assay, 46 control plasma samples from noncancer patients were analyzed (see Materials and Methods). Three samples presented a low number of *NPY* droplets (higher than LOB but lower than LOD; see online Supplemental Table 4 and Supplemental Fig. 4).

To further confirm these results, 85 additional plasma samples were analyzed (43 collected at diagnosis of localized CRC and 42 collected from mCRC patients under follow-up) (see online Supplemental Table 5). The samples were chosen such that 28 presented a mutation within their tumor for which a dPCR assay had been developed and validated (see Materials and Methods section and online Supplemental Table 5). Among these patients, 23 presented detectable MutctDNA (0.02%-5.8% for localized cancer patients and 0.77%-51.9% for mCRC patients). Nineteen patients with detectable MutctDNA were positive for WIF1 or NPY markers with the fraction of MetctDNA ranging from 0.01% to approximately 100% (4 patients had insufficient amplifiable genomes to be detected). The analysis of a higher quantity of ctDNA probably would have allowed detection in these patients.

A high correlation between MutctDNA and MetctDNA was observed (Fig. 4, A and B, $R^2 = 0.89$ and 0.85 for *WIF1* and *NPY* markers respectively, *P* values <0.0001, nonparametric Spearman test). Samples without detectable MutctDNA (n = 11) were also negative for the presence of MetctDNA. As expected from the correlation with MutctDNA, the fraction of MetctDNA was significantly higher in mCRC compared to localized CRC (Fig. 3C, Mann–Whitney test, *P* <



0.0001). In addition, we observed clearance or decrease of MetctDNA after tumor resection in 73% of the cases (plasma DNA of 22 patients analyzed, see online Supplemental Table 6). These results were confirmed by MutctDNA analysis confirming specificity of the developed assay.

Overall, among the samples that were not tested for MutctDNA by droplet-based dPCR, [i.e., patient samples that had no mutations for which a dPCR assay had been developed and validated (see Materials and Methods section)] within the tumor or not analyzed (samples from 38 localized CRC and 35 mCRC patients), MetctDNA was detected in 80% of mCRC patients (68.6% of the samples with number of observed droplets higher than LOD) and 44.7% of localized CRC patients (28.9% of the samples with number of observed droplets higher than LOD).

Online Supplemental Table 7 summarizes the results described here for the MetctDNA analysis.

PICOLITER DROPLET-BASED dPCR ANALYSIS FOR THE NONINVASIVE FOLLOW-UP OF COLORECTAL CANCER PATIENTS

To further evaluate the pertinence of hypermethylated DNA analysis for patients' follow-up, we tested



Fig. 5. Monitoring of MutctDNA (%, purple) and WIF1 MetctDNA (%, light blue) for 6 patients (A-F) with localized CRC.

plasma DNA samples of 9 patients with *KRAS*, *BRAF* (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) or *TP53* (tumor protein p53) mutated tumors and for whom the fraction of MutctDNA was measured during treatment follow-up. Fig. 5 and Fig. 6 show that the variations the MetctDNA and MutctDNA fractions were correlated, further validating the chosen approach. The 6 first patients (Fig. 5, A–F) presented a localized

CRC and were evaluated for tumor recurrence. For these patients, tumor tissue was available at diagnosis, plasma samples were available at diagnosis after surgery, and then every 3–5 months for up to 3 years follow-up. Within these patients, patient 1A (Fig. 5A) presented MetctDNA (and MutctDNA) at diagnosis but no ctDNA was detected after surgery and during the 3-year follow-up and this patient did not present a recurrence of



his cancer during this period. Interestingly, even 7 years after the end of the follow-up this patient did not present a recurrence of the disease. For the 5 other patients (Fig. 5, B-F), an increase of ctDNA was observed during follow-up before the clinical detection of the cancer recurrence. Four of them (Fig. 5, B, C, E and F) had detectable of both MetctDNA and MutctDNA at diagnosis, followed by a decrease of ctDNA and then an increase before recurrence diagnosis. One of them (Fig. 5D) had no detectable MetctDNA (and MutctDNA) at diagnosis, but ctDNA was detectable before recurrence assessment. The 3 patients described in Fig. 6, A–C presented a metastatic disease and were followed for tumor progression under chemotherapy treatment. For these 3 patients, an increase of both MetctDNA and MutctDNA was observed before detection of disease progression (RECIST).

Discussion

Detection of ctDNA is one of the most promising approaches for improving tumor monitoring in different types of cancers. MutctDNA, so far, has been the most studied and these studies have highlighted the great potential of this marker (35). However, there are clear limitations to approaches based on the monitoring of MutctDNA, including the necessity to previously identify specific mutation in the archived tumor tissue. In addition, even when a tumor-specific mutation is identified, it may not be usable for routine monitoring (no available or set-up assays for example). Universal biomarkers are thus needed for ctDNA detection and monitoring.

Based on the work presented here, MetctDNA determination using WIF and NPY markers appears to be a promising surrogate biomarker of tumor burden in CRC patients. First of all, we showed that methylated DNA in cancer tissue was detectable throughout the development of the disease, even in early stage tumors, suggesting that these hypermethylated loci appear as an early and persistent event in tumorigenesis. These results are appealing, since, in contrast, analysis of primitive tumors of CRC patients as described in cBioPortal, for 12 most frequently reported mutations [i.e., KRAS p.G12D, p.G12V, p.G13D, p.A146T, phosphatidylinositol-4,5bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PI3KCA) p.E545K, BRAF p.V600E, TP53 p.R175H, p.R248W, p.R213*, neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog (NRAS) p.Q61K, and adenomatous polyposis coli (APC) p.R1450*] revealed that only 46.2% of the patients were positive for one of these mutations in tumor tissue (36, 37).

Secondly, we found that MetctDNA could be detected in 80% of metastatic CRC patients and 44.7% of localized CRC patients (stage II and III). Moreover, MetctDNA and MutctDNA fractions appeared strongly correlated. To our knowledge, there is no biological relation between MetctDNA and the presence of any tested mutation; therefore, the observed correlation suggests that the detection of MetctDNA is owing to the presence of ctDNA. Our newly developed test brings the information regarding the presence of circulating DNA independently of the a priori knowledge the tumor mutation and can be used for the quantification of ctDNA during patient follow-up. This test is not directed at the detection of druggable mutations. These fractions of positive patients are comparable to results obtained when screening MutctDNA for tumor-specific mutations (when such a mutation was detected and an assay developed) with the advantage of detecting a significantly higher fraction of patients with just 2 assays. Indeed, we previously described that, MutctDNA (34) can be detected in 84% of mCRC patients with KRAS or BRAF mutated tumors and more recently that, the fraction of stage II-III CRC patients with detectable MutctDNA was 21.6% (17/79) (38). As for the detection of MutctDNA, we found that the fraction of MetctDNA was correlated to tumor stage (Fig. 4C) (39).

These results are highly complementary to those in the large body of literature demonstrating the pertinence of ctDNA monitoring. As compared to conventional procedures based on MutctDNA monitoring, which require a large number of assays, our method based on MetctDNA allows the same efficiency for detecting ctDNA to be reached by screening for just 2 markers in all patients. In this work, the analysis of 105 tumors by targeted sequencing highlighted that the use of 45 different assays would have allowed 95 patients to be followed (10 tumors remaining with undetected mutations). The gain in terms of validation time and cost for the implementation of such markers in routine laboratories is important and advocates for our method. With WIF1 and NPY markers being found to be hypermethylated in a large fraction of tumor tissues, independently of the stage of the cancer, our results suggest that ctDNA monitoring can be performed without analysis of the tumor DNA (which may be inaccessible or of poor quality). In addition, these results suggest that monitoring of MetctDNA was as efficient as the monitoring of MutctDNA for the detection of CRC recurrence in plasma of patients with localized disease, and for monitoring treatment efficiency for patients with advanced CRC (18, 40).

In conclusion, our data indicate that the monitoring of ctDNA could be performed using just 2 methylation markers instead of tumor-specific mutations. MetctDNA appears to be a universal approach to follow tumor burden of CRC patients, as compared with MutctDNA, which requires previous tumor mutation identification. These results demonstrate that the combination of picoliter droplet-based dPCR and pertinent methylation markers allows the development of a highly useful tool for ctDNA monitoring of CRC patients and this method could be extended to other tumor types.

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the author disclosure form. Disclosures and/or potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: E. Zonta, INSERM Physicancer program (no. PC201423); J.B. Hutchinson, RainDance Technologies; D. Link, RainDance Technologies.

Consultant or Advisory Role: G. Perkins, Sanofi; O. Bouche, Roche and Merck Serono; A. Zaanan, Roche, Merck, Amgen, Sanofi, and Lilly; P. Laurent-Puig, Merck Serono, Amgen, Integragen, and Boehringer Ingelheim; I. Sobhani, Profilome; V. Taly, RainDance Technologies, and Boehringer Ingelheim.

Stock Ownership: J.B. Hutchinson, RainDance Technologies; D. Link, RainDance Technologies.

1. Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, Colombo N, Gelao L,

Fumagalli L, et al. Monitoring tumor-derived cell-free

DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives

and research opportunities. Cancer Treat Rev 2014;40:

2. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a

3. Taly V, Pekin D, Abed AE, Laurent-Puig P. Detecting bio-

4. Huggett JF, Whale A. Digital PCR as a novel technology

5. Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M,

6. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC,

et al. Circulating tumor DNA as an early marker of ther-

aneutic response in patients with metastatic colorectal

Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitat-

ing circulating tumor DNA with broad patient coverage.

7. Kidess E, Heirich K, Wiggin M, Vysotskaia V, Visser BC,

Marziali A, et al. Mutation profiling of tumor DNA from

plasma and tumor tissue of colorectal cancer patients

with a novel, high-sensitivity multiplexed mutation de-

tection platform. Oncotarget 2015;6:2549-61.

Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. Proc Natl Acad Sci

9. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein

B. Transforming single DNA molecules into fluorescent

magnetic particles for detection and enumeration of ge-

netic variations. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:

sura S, Mizuno A. Single-molecule PCR using water-in-

Salem C, et al. Quantitative and sensitive detection of

10. Nakano M, Komatsu J, Matsuura S, Takashima K, Kat-

11. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, Le Corre D, Mazutis L, Ben

oil emulsion. J Biotechnol 2003;102:117-24.

and its potential implications for molecular diagnostics.

liquid biopsy for cancer. Clin Chem 2015;61:112-23.

markers with microdroplet technology. Trends Mol Med

648-55

2012:18:405-16

Clin Chem 2013;59:1691-3.

Nat Med 2014;20:548-54.

USA 1999;96:9236-41.

8817-22.

cancer. Ann Oncol 2015;26:1715-22.

References

rare mutations using droplet-based microfluidics. Lab Chip 2011;11:2156-66.

- Pinheiro L, Emslie KR, Hindson BJ, Hindson C, Herrmann J, Coleman VA, Bhat S. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. Anal Chem 2011;84:1003–11.
- Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal Chem 2011;83:8604–10.
- Hatch AC, Fisher JS, Tovar AR, Hsieh AT, Lin R, Pentoney SL, et al. 1-million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR. Lab Chip 2011;11: 3838–45.
- Huggett JF, Cowen S, Foy CA. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. Clin Chem 2015;61:79–88.
- 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;486:537-40.
- 17. Tsao SC, Weiss J, Hudson C, Christophi C, Cebon J, Behren A, Dobrovic A. Monitoring response to therapy in melanoma by quantifying circulating tumour DNA with droplet digital PCR for BRAF and NRAS mutations. Sci Rep 2015;5:11198.
- Reinert T, Schøler LV, Thomsen R, Tobiasen H, Vang S, Nordentoft I, et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. Gut 2016;65:625–34.
- 19. Olsson E, Winter C, George A, Chen Y, Howlin J, Tang MHE, et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. EMBO Mol Med 2015;7: 1034-47.
- 20. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer

Honoraria: P. Laurent-Puig, Merck Serono, Amgen, Integragen, and Boehringer Ingelheim; V. Taly, RainDance Technologies and Boehringer Ingelheim.

Research Funding: F. Garlan, fellowship within the Frontiers in Life Science PhD program (FdV) from the Foundation Servier; V. Taly, French Ministry of Research, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Université Paris-Descartes, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Institut National du Cancer (INCA, no. 2009-1-RT-03-US-1 and 2009-RT-03-UP5-1), Association pour la recherche contre le cancer (ARC, no. SL220100601375), Agence Nationale de la Recherche (ANR Nanobiotechnologies, no. ANR-10-NANO-0002-09), SIRIC CARPEM, French canceropole funding (no. 2011-1-LABEL-UP5-2).

Expert Testimony: None declared.

Patents: I. Sobhani, 20110129840, 20130288918, Japan no. 2013-537189, and US 12/865/408.

Role of Sponsor: The funding organizations played no role in the design of study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, and final approval of manuscript.

Acknowledgments: The authors thank Raphaël Pantier for preliminary experiments and Michael Samuels for critical reading of the manuscript. The CETRAS study was sponsored by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris and funded by a grant from the French Ministry of Health (Programme hospitalier de recherche Clinique 2006, AOM 06198).

patients. Nat Med 2015;21:795-801.

- Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, et al. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. Nat Biotechnol 2009;27:858–63.
- 22. 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. Mol Oncol 2014;8:927-41.
- 23. Jiang P, Chan CW, Chan KC, Cheng SH, Wong J, Wong W, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112:E1317-25.
- 24. Budnik LT, Kloth S, Baur X, Preisser AM, Schwarzenbach H. Circulating mitochondrial DNA as biomarker linking environmental chemical exposure to early preclinical lesions elevation of mtDNA in human serum after exposure to carcinogenic halo-alkane-based pesticides. PLoS One 2013;8:e64413.
- 25. Mangolini A, Ferracin M, Zanzi MV, Saccenti E, Ebnaof SO, Poma VV, et al. Diagnostic and prognostic micro-RNAs in the serum of breast cancer patients measured by droplet digital PCR. Biomark Res 2015;3:12.
- 26. Sharma G, Mirza S, Parshad R, Gupta SD, Ralhan R. DNA methylation of circulating DNA: a marker for monitoring efficacy of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. Tumour Biol 2012;33:1837-43.
- 27. Wittenberger T, Sleigh S, Reisel D, Zikan M, Wahl B, Alunni-Fabbroni M, et al. DNA methylation markers for early detection of women's cancer: promise and challenges. Epigenomics 2014;6:311–27.
- 28. Hayashi M, Guerrero-Preston R, Sidransky D, Koch WM. Pax5 methylation detection by droplet digital PCR for ultra-sensitive deep surgical margins analysis of head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Prev Res (Phila) 2015;8:1017-26.
- Barault L, Amatu A, Bleeker FE, Moutinho C, Falcomata C, Fiano V, et al. Digital PCR quantification of MGMT

methylation refines prediction of clinical benefit from alkylating agents in glioblastoma and metastatic colorectal cancer. Ann Oncol 2015;26:1994–9.

- Roperch JP, Incitti R, Forbin S, Bard F, Mansour H, Mesli F, et al. Aberrant methylation of NPY, PENK, and WIF1 as a promising marker for blood-based diagnosis of colorectal cancer. BMC Cancer 2013;13:566.
- Menegaux F, Truong T, Anger A, Cordina-Duverger E, Lamkarkach F, Arveux P, et al. Night work and breast cancer: a population-based case-control study in France (the Cecile study). Int J Cancer 2013;132:924–31.
- 32. Milbury CA, Zhong Q, Lin J, Williams M, Olson J, Link DR, Hutchison B. Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. Biomol Detect Quantif 2014;1:8–22.
- 33. Laurent-Puig P, Pekin D, Normand C, Kotsopoulos SK,

Nizard P, Perez-Toralla K, et al. Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. Clin Cancer Res 2015;21:1087-97.

- 34. Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. Clin Chem 2013;59:1722– 31.
- 35. Ma M, Zhu H, Zhang C, Sun X, Gao X, Chen G. "Liquid biopsy" - ctDNA detection with great potential and challenges. Ann Transl Med 2015;3:235.
- 36. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal 2013;6:pl1.
- 37. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. Cancer Discov 2012;2:401-4.
- 38. Laurent-Puig P, Bouché O, Niarra R, Aucouturier P, Benhaim L, Landi B, et al. Circulating tumor DNA as a prognostic marker in colorectal cancer: preliminary results of a prospective trial. Cancer Res 2015;75:5235.
- 39. 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. Sci Transl Med 2014;6:224ra24.
- 40. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. Nat Med 2015;21:827.

1) Développement d'un test de l'hyperméthylation de l'ADNtc : vers un biomarqueur universel du cancer colorectal

Aspects techniques du développement des tests en PCR digitale en gouttelettes

Des tests de détection en duplex d'une cible méthylée (*WIF/NPY/PENK*) et d'une référence (albumine) ont été développés en PCR digitale en gouttelettes. Ils ont été caractérisés de façon à préciser la sensibilité, par des dilutions en série, et la spécificité, grâce à l'analyse d'échantillons négatifs. Des telles caractérisations sont en accord avec les recommandations MIQE, et garantissent la fiabilité des résultats d'analyse d'échantillons (tel que discuté dans la partie A.I.). En particulier, le test de l'hyperméthylation de *PENK* générait une LOB élevée et il a été choisi de ne pas l'utiliser pour les analyses d'échantillons.

Le test de l'hyperméthylation requière un traitement chimique au bisulfite de l'ADN, et pourrait générer une perte importante d'ADN. Il a été observé une perte d'ADN générée par la conversion bisulfite, aboutissant à un taux de récupération pouvant être limitée à 50-70%. En optimisant les conditions de l'expérience, nous avons pu passer à plus de 80%, en procédant à 2 étapes successives d'élution sur colonne suivie de centrifugation, et en concentrant l'ADN purifié dans un volume d'élution minimum (10µL).

La quantification de l'hyperméthylation de séquences spécifiques (ilôts CpG de séquences promotrices de gènes) cible une méthylation totale (100%) ou nulle (0%). Les tests en PCR digitale en gouttelettes permettent de visualiser les ADN cibles par la répartition des gouttelettes sur les graphiques, en fonction de la fluorescence. Cela permet de détecter un bruit présent de façon récurrente ou transitoire (comme dans le cas d'une contamination). Les ADN d'échantillons de patients généraient parfois un bruit, observé par des populations de gouttelettes intermédiaires entre les gouttes vides et les gouttes positives (ADN hyperméthylé). Cependant, un tel bruit était peu visible à l'anayse d'ADN de plasmas de sujets sains ou d'ADN génomiques non méthylés. Ce bruit pourrait être dû à l'efficacité de l'amplification PCR ou à la présence de séquences partiellement méthylées.

Vers un biomarqueur universel du cancer ?

L'étude de la méthylation présente plusieurs enjeux pour la compréhension des mécanismes de tumorigenèse, la détection de marqueurs pronostiques, de suivi, et diagnostique, et pour la détection de cibles thérapeutiques. Dès lors que le mécanisme de méthylation aberrante touche des gènes de voies de signalisation clefs dans la cancérogenèse, il est d'intérêt d'explorer son potentiel comme marqueur universel pour plusieurs raisons : 1) analyser la méthylation aberrante de gènes ne requière pas l'identification d'altérations dans la tumeur en amont, 2) c'est un marqueur potentiel permettant de cibler une large de population de patients, 3) la méthylation de gènes cibles pourrait être communes à plusieurs cancers, et ainsi ouvrir la voie vers un marqueur pan-cancer.

• S'affranchir de la détermination du statut mutationnel

Il existe une forte corrélation entre la détection de mutations *KRAS*, *BRAF*, ou *TP53* mutés et l'hyperméthylation de *NPY* ou *WIF1*. De plus, la mesure de l'hyperméthylation des gènes *WIF1*, *NPY* et *PENK* a démontré que ces altérations épigénétiques étaient détectables à tous les stades du cancer, même précoces, et de façon spécifique de l'ADN de tissu tumoral. En conséquence, l'étude de la méthylation dans l'ADNtc apparaît comme une alternative au suivi chez des patients ne présentant pas de mutation pour laquelle un test est disponible. La détection de la méthylation de gènes impliqués dans la cancérogenèse semble être une alternative intéressante à la détection en amont d'altérations tumorales (coûteuse, laborieuse). Par ailleurs, la détection de l'ADNtc hyperméthylé, chez des patients atteints de cancer colorectal précoce (dans les tissus tumoraux), suggère que cet évènement pourrait être utilisé pour le diagnostic.

Identification de « facteurs » communs aux cancers

Les gènes impliqués dans la tumorigenèse du cancer colorectal sont actifs dans différentes voies de signalisation. Notamment, la voie WNT contrôle la prolifération cellulaire et l'homéostasie. Le gène *WIF1* (Wnt Inhibitor Factor1) est impliqué dans cette voie et dès lors qu'il est rendu inactif par une méthylation anormale de son promoteur, une activation de WNT se produit. Le phénomène d'activation de la voie WNT a été reporté dans de nombreuses études^{326–328} et dans divers types de cancers.

Le gène *NPY* (neuropeptide Y) serait impliqué dans la motilité des cellules et jouerait le rôle de limiteur d'invasion des tumeurs. Il a aussi été étudié dans divers types de cancer¹⁸¹.

PENK (Proenkephaline K) a été étudié dans les systèmes nerveux et endocrinien et serait actif dans les processus de mort cellulaire, jouant un rôle pro-apoptotique¹⁸¹. D'après de récentes études, il serait hyperméthylé dans divers cancers en plus du colon comme le cancer de la prostate³²⁹, le glioblastome³³⁰, ou encore le cancer du sein³³¹. Il est à noter que dans le carcinome hépato-cellulaire³³², une étude a porté sur l'ADN extrait du sang de patients démontrant l'hyperméthylation, parmi d'autres, de PENK, grâce à une étude par pyroséquençage. Ces gènes seraient donc impliqués dans la cancérogenèse de divers tissus tumoraux, suggérant le développement de signatures moléculaires communes à plusieurs types de cancers.

Hyperméthylation d'un ou plusieurs gènes dans différents types de tumeurs : études pan-cancer

Une étude récente a porté sur l'analyse de tissus de tumeurs de l'endomètre, du colon, du poumon, du sein et de l'estomac par NGS pour la détection de cibles méthylées³³³. L'hyperméthylation du gène ZNF154 a été observée dans 15 types de tumeurs dans une étude précédente des auteurs. Une analyse « pan-cancer » a été ainsi réalisée, comparant plus de 180 tumeurs (parmi les 5 types tumoraux) au total à des tissus normaux, afin de définir des motifs de méthylation.

Les auteurs ont ensuite effectué une simulation bio-informatique de détection de la méthylation dans le sang par dilution du signal positif au sein de signal négatif (1% d'ADN de tumeur dans 99% dADN de tissu normal). L'objectif était de mesurer la capacité de discrimination entre tissus normal et tumoral à de fortes dilutions. Les auteurs estiment une capacité de détection de 1% d'ADNtc méthylé

parmi de l'ADN circulant normal (AUC=0.74). Une étude récente a analysé 5480 échantillons de tumeurs répartis sur 15 types de cancer³³⁴. Des profils pan-cancer hypo- ou hyper-méthylés ont pu être observés et 6 groupes de motifs ont été distingués, touchant des gènes impliqués dans la cancérogenèse.

Vers l'établissement d'une signature moléculaire « circulante » ?

Dans le but de détecter des biomarqueurs non invasifs et présentant les avantages des biopsies liquides, plusieurs études décrivent la méthylation de l'ADNtc dans un type donné de tumeur. Notamment dans le cancer du poumon avec la cible *APC*³³⁵, de l'estomac³³⁶, du sein avec la méthylation du gène *RASSF1A*³³⁷, qui a aussi été détectée dans le cancer de l'estomac³³⁸. Il est alors évident que les gènes fréquemment impliqués dans la cancérogenèse sont de potentiels marqueurs communs à des cancers différents, par leur méthylation aberrante.

Discussion quant à la sensibilité et la spécificité de la méthylation

La spécificité de la méthylation peut s'avérer discutable en regard des altérations génétiques qui, elles, sont des phénomènes binaires par leur présence ou leur absence. En effet, la quantification de l'ADN méthylée est impactée par la présence de changement au sein de la tumeur et des tissus environnant¹⁷⁹.

D'autres facteurs peuvent influer sur la méthylation, de façon non spécifique de la tumeur. Plusieurs études ont démontré que la régulation épigénétique était liée à l'âge notamment par une augmentation de la fréquence de la méthylation. Etant donné l'occurrence d'évènements de méthylation/déméthylation de gènes dans les tissus non tumoraux, il est impératif d'évaluer la méthylation de plusieurs gènes. Ceci souligne l'importance de la sélection de gènes candidats cibles particulièrement pertinents pour le suivi et le diagnostic de patients.

La spécificité de la méthylation est donc un paramètre à caractériser précisément, comme cela avait pu être fait dans l'étude présentée dans ce projet, par la comparaison de tissus adjacents, et de contrôles négatifs (ADN génomique normal) aux tissus de tumeurs. En outre, la sensibilité de l'ADNtc hyperméthylé est très importante en raison de la présence de méthylation aberrante dès les premiers évènements de cancérogenèse.

PARTIE **B** : APPLICATIONS CLINIQUES DE LA DETECTION DE L'ADN TUMORAL CIRCULANT AU SUIVI DES PATIENTS

PREAMBULE

Il existe peu d'options thérapeutiques pour les patients en maladie avancé, et les traitements entraînent souvent une forte toxicité. Un objectif, dans le cadre de la médecine personnalisée, est d'optimiser la prise en charge de ces patients. Dans ce but, il faut pouvoir détecter le plus tôt possible un manque de réponse au traitement avant qu'une progression clinique soit observée. Cela permettrait de changer le traitement, d'adapter la dose afin d'optimiser le rapport bénéfice/risque de la thérapie.

Le ciblage des altérations portées par les fragments circulants, à l'aide de tests développés en PCR digitale en gouttelettes présentés en partie A, démontre la possibilité de quantifier l'ADNtc de façon précise, sensible et spécifique. Il serait donc possible de suivre l'évolution de la maladie, et détecter précocement des variations représentatives de la réponse au traitement.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la valeur pronostique et/ou prédictive de l'ADNtc dans deux types de cancer au stade métastatique. Cette deuxième partie porte sur l'application de la détection de l'ADNtc au suivi de patients atteints de cancer B.I) colorectal et B.II.) de mélanome, dans les deux cas en stade IV.

Une autre étude, présentée en annexe, a porté sur l'évaluation de l'impact clinique de la quantification de l'ADNtc dans le cancer du pancréas, au cours du suivi des patients. Ma contribution à cette étude a concerné l'aide à la mise en place de la stratégie d'analyse des échantillons d'ADN plasmatique (ie. criblage de mutations KRAS les plus fréquemment identifiées dans le cancer du pancréas) et à l'interprétation des résultats de PCR digitale en gouttelettes, en collaboration avec Daniel Pietrasz, 1^{er} auteur de l'article.

PLAN DE LA PARTIE B

- <u>Chapitre B.I.:</u>
 - Sous-chapitre **B.I.1.** : *Présentation de l'étude PLAsma COLon (PLACOL).*
 - Sous-chapitre **B.I.2**. : Article en préparation « Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL study) ».
- Chapitre B.II. :
 - Sous-chapitre **B.II.1.** : Introduction et présentation de l'étude sur le mélanome.
 - Sous-chapitre **B.II.2**. : Quantification de l'ADNtc chez des patients atteints de mélanome métastatique et mesure de la concentration en vémurafenib : impact pronostique.

CHAPITRE B.I. ETUDE PLACOL

B.I.1. PRESENTATION DE L'ETUDE PLACOL

Cette étude, appelée PLACOL (PLAsma COLon, **Figure 56**), visait à déterminer la faisabilité de la détection de l'ADNtc chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique, et évaluer les valeurs pronostique et prédictive de ce marqueur.

Dans un premier temps, le test de la tumeur pour la présence des mutations *KRAS* fréquentes, ou de la mutation *BRAF* ont été réalisés dans le cadre du soin. Ce génotypage de la tumeur permettait de cibler une altération dans le plasma. De façon cohérente avec la littérature, seulement environ 40% des patients étaient porteurs d'une de ces mutations³³⁹. Il fallait trouver une alternative à la détermination du statut mutationnel.

Dans ce contexte, le projet portant sur l'étude de la méthylation, commun à plusieurs projets au sein du laboratoire d'accueil, a été débuté. Des gènes avaient été identifiés dans le cancer colorectal comme hyperméthylées dans la tumeur, d'parès l'étude de Roperch *et al.*¹⁸¹. L'article présenté en partie A.III a démontré que ces cibles étaient spécifiques du tissu tumoral et de l'ADNtc, reflet du génome de la tumeur.

Sur cette base, nous avons pu appliquer les tests que nous avions développés pour cibler une grande partie de la cohorte, pour laquelle nous n'avions pas de marqueur à suivre dans le plasma. L'étude PLACOL est donc pionnière dans la quantification de l'ADN muté ou hyperméthylé circulant, et par des tests précis développés en PCR digitale en gouttelettes.

Au-delà de cet aspect, il existe un réel besoin d'optimisation du suivi des patients atteints de cancer, et en particulier en stade IV. Dès lors que la maladie est avancée, le recours à la chirurgie est nécessite un premier traitement afin de diminuer les lésions métastatiques, et les agents thérapeutiques souvent limités aux chimiothérapies cytotoxiques, parfois peu efficaces.

En outre, les marqueurs de suivi actuels ne permettent pas d'évaluer de façon spécifique et sensible l'évolution de la maladie, comme souligné dans la partie introductive de ce manuscrit. Il existe donc une réelle nécessité de détecter et développer un marqueur qui ait une application clinique potentielle. Dans ce cadre, l'ADNtc a été étudié dans le cancer colorectal, et notamment métastatique. Cependant, les analyses étaient limitées par les techniques utilisées, trop peu sensibles pour exploiter le potentiel de l'ADNtc.

Dans notre étude, nous explorons les paramètres permettant d'analyse des variations de l'ADNtc, comme des marqueurs potentiels. Il ne s'agit pas seulement d'évaluer un ratio, ou une différence de pourcentage entre deux points, mais de caractériser les variations d'ADNtc pour comprendre quels paramètres (atteinte d'un seuil, pente de décroissance) prennent en compte la dynamique de ce marqueur, et en conséquence, sont le reflet de l'évolution de la maladie.



Quantification de l'ADNtc plasmatique par PCR digitale en gouttelettes

Figure 56. Conception de l'étude clinique PLACOL. Un total de 115 patients a été inclus dans l'étude PLACOL supervisée par le Dr. A.Zaanan. Au moment du diagnostic métastatique, l'ADN extrait de tumeur était testé (par NGS ou qPCR) pour la présence de mutations. Avant chaque cycle de chimiothérapie (C0, C1 etc), le plasma des patients était prélevé et l'extraction de l'ADN, en vue de l'analyse par PCR digitale, était réalisée au laboratoire.Tous les deux mois environ, une évaluation clinique de l'évolution du cancer était réalisée par imagerie et par le dosage des marqueurs sériques (ACE).

Dans l'étude PLACOL, 115 patients ont été initialement inclus dans cette étude. Suite au diagnostic de cancer métastatique, un test de génotypage de la tumeur est réalisé (NGS ou qPCR). Avant chaque cycle de chimiothérapie, un échantillon de sang a été collecté durant le traitement. Le plasma a ensuite été récupéré, et l'ADN extrait pour le ciblage, dans le plasma, de la mutation identifiée dans l'échantillon tumoral. La PCR digitale en gouttelettes a été utilisée pour ces tests de détection de l'ADNtc. En parallèle, les évaluations cliniques par imagerie et dosage de marqueurs sanguins (ACE) ont été réalisées (**Figure 56**). La mesure des variations de l'ADNtc ont été réalisés chez des plusieurs patients (**Annexe B.I.**), et représentés en parallèle du suivi clinique.

Dans l'étude qui est présentée dans ce manuscrit, nous nous sommes intéressés à la valeur pronostique de l'ADNtc, et sa valeur prédictive de l'efficacité thérapeutique. Les patients inclus en lignes 1 et 2 de traitement ont été pris en compte dans l'étude (N=82). En outre, en vue d'étudier la détection précoce d'une réponse au traitement ou au contraire d'une non efficacité, les trois premiers prélèvements ont été évalués dans l'étude présentée dans l'article suivant.

B.I.2. ARTICLE EN PRÉPARATION

«Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL study)"

Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL study)

<u>Authors:</u> Garlan F¹, Laurent-Puig P^{1, 3}, Siauve N⁴, Didelot A¹, Perkins G^{1, 2}, Blons H^{1, 3}, Taieb J^{1, 2}, Taly V¹ and Zaanan A^{1, 2}.

Affiliations :

¹Université Paris Sorbonne Cité; INSERM UMR-S1147; CNRS SNC5014; Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Paris, France, équipe labellisée Ligue Nationale Contre le cancer.

²Department of Digestive Oncology, European Georges Pompidou Hospital, AP-HP, Paris, France ³Department of Biology, European Georges Pompidou Hospital, AP-HP, Paris, France

⁴Department of Medical Imaging, European Georges Pompidou Hospital, AP-HP, Paris, France

Corresponding Authors: Valerie.taly@parisdescartes.fr and Pierre.laurent-puig@parisdescartes.fr

Keywords: circulating tumor DNA (ctDNA), metastatic colorectal cancer (mCRC), prognostic marker, picoliter-droplet digital PCR.

List of tables (presented at the end of the article):

Table 1: Patients' characteristics and ct DNA concentration at baseline

<u>Table 2.</u> Prognostic value ctDNA concentration at baseline on overall survival adjusted on gender, Age, ECOG PS, treatment line, metastatic synchronicity.

<u>**Table 3.**</u> Impact on progression free survival and overall survival of variations in ctDNA concentrations between C_0 and C_{2or1} and adjustment on variables.

Abstract

Background. Circulating mutated DNA (ctDNA) has been detected in various cancer types and suggested as a prognostic marker. A recent study interrogated the correlation between hypermethylation and *KRAS/BRAF* mutational status in plasmatic DNA of colorectal cancer patients using picoliter-droplet digital PCR. The present study is pioneer in the evaluation the prognostic and predictive value of ctDNA using a universal colorectal cancer marker as a complement to mutational status interrogation for wild-type *KRAS/BRAF* patients. The impact of ctDNA variations on survival (PFS and OS) will be precisely characterized in patients undergoing various treatments. We aim to provide a parameters of ctDNA analysis allowing to exploit the full potential of this biomarker using the high sensitivity and accuracy of the picoliter-droplet digital PCR tool.

Patients, material and methods. All consecutive mCRC patients receiving treatment were included in this monocentric prospective study between October 2012 and April 2015 (N=82). Plasma samples were collected before the first cycle of chemotherapy (C₀), then at week 2 (C₁) or 4 (C₂). For each patient, tumor DNA was tested in tissues for the presence of *KRAS*, *BRAF* and *TP53* mutations either by conventional qPCR or Next-Generation Sequencing. When none of these mutations was identified in the tumor, ctDNA was screened for hypermethylated sequences of *WIF1* and *NPY* genes. Circulating mutated or hypermethylated sequences were quantified (ng/mL) using picoliter droplet-based digital PCR coupled to Taqman® detection probes. The impact of ctDNA concentration on survival (PFS, OS) and tumor response (RECIST 1.1) was analyzed using the Cox model with adjustment on age, sex, ECOG PS, treatment line and metastasis synchronicity.

Results. Baseline ctDNA concentration is significantly associated with a worse prognosis when exceeding 10 ng/mL in comparison with concentrations below 0.1 ng/mL (HR=5.64, $Cl_{95\%}$ [2.5-12.6], p<0.0001). During the follow-up, three groups of patients were discriminated according to ctDNA variations in concentration.

First, a decreasing profile was defined, corresponding to ctDNA concentrations falling below 0.1 ng/mL at first evaluation ($D_{<0,1ng/mL}$, N=40). A second profile corresponds to a decrease in ctDNA concentration without reaching 0.1ng/mL ($D_{>0,1ng/mL}$, N=26) at C_{2or}. And finally, an increasing profile was defined, with rising ctDNA concentrations between C₀ and C_{2or1} ($I_{>0,1ng/mL}$, N=7).

The D_{<0,1ng/mL} profile was significantly associated with a worse PFS and OS in comparison to groups D_{>0,1ng/mL}(PFS: HR=2.22, Cl_{95%}[1.18-4.16], p=0.013; OS: HR=2.85, Cl_{95%}[1.38-5.89], p=0.004) and a shorter PFS when compared to group l_{≥0,1ng/mL} (PFS:HR=3.71, Cl_{95%}[1.46-9.45], P=0.006; OS: HR=2.95, Cl_{95%}[0.84-10.34], P=0.09). In D_{>0,1ng/mL} profiles, the decreasing slope was significantly decisive on the PFS with a better prognosis when ctDNA concentrations decreased with a slope of at least 80% (HR=0.96, Cl_{95%}[0.92-0.99], P=0.015).

Finally, a composite marker was defined both the 0.1 ng/mL threshold and the slope of decrease (>80%). Good responders (N=58,) were discriminated from bad responders (N=15). Tumor response was better in patients whom ctDNA concentration passed below 0.1ng/mL at C_{2or1} or decreased with a slope higher than 80% (good ctDNA responders) in comparison to other (bad ctDNA responders). Good ctDNA responders had a longer median PFS (8.5 vs 2.4 months; HR=0.19, Cl_{95%}[0.09-0.40], P<0.0001) and OS (27.1 vs 11.2 months; HR=0.25, Cl_{95%} [0.11-0.57], P<0.001).

Conclusion. This study suggests that ctDNA parameters, i.e. ctDNA threshold and slope of decrease, are significant prognostic markers in mCRC, allowing to predict PFS and tumor response. The quantification of circulating tumor DNA by picoliter droplet-based digital PCR is strongly relevant to evaluate markers that require a high sensitivity (ie. 0.1 ng/mL threshold). It would worth validating our findings by further investigation.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the second most commonly diagnosed cancer in Europe and a leading cause of death both in Europe and worldwide¹. Increasing number of active agents and the associated biomarker-driven selection have improved outcomes of patients with metastatic CRC (mCRC)². One crucial goal of patient treatment strategy is to improve survival while maintaining the quality of life and avoiding needless toxic effects of an ineffective treatment, especially for patients without curative intent. To reach this aim, the early evaluation of therapeutic efficacy is a key-point in the patient management strategy.

The current gold standard for assessing tumor response and treatment efficacy is the radiographic imaging based on the « Response Evaluation Criteria in Solid Tumors » (RECIST) criteria³. However, serial radiographic imaging is expensive, time consuming, inconvenient and contributes to accumulation of ionizing radiation. Moreover, the RECIST criteria present drawbacks: poor inter-observer reproducibility⁴, the difficulty to assess the response in absence of measureable lesions, and also in context of targeted therapies whose efficacy often does not correspond to tumor shrinkage, notably with antiangiogenic therapy⁵. In addition, biological evaluation is not very accurate in determining the response to treatment. Measurement of carcinoembryonic antigen (CEA) level has reasonable sensitivity but its variation during the course of the disease does not always reflect tumor response or progression, being sometimes misleading ^{6,7}. Therefore development of new biomarkers of tumor response is required.

Circulating tumor DNA (ctDNA) has been suggested as a potential biomarker for tailoring treatment in various solid cancers^{8–10}. Strategies based on ctDNA detection require prior analysis of tumor tissue for the identification of somatic alteration(s), which can be used for monitoring changes of ctDNA plasmatic concentration during treatment. In mCRC, some studies have demonstrated the prognostic value of ctDNA^{11,12}, as well as its interest in the determination of treatment resistance to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) therapy with the emergence of mutated *RAS* alleles detected in the blood^{13–15}. The clinical utility of ctDNA as a potential biomarker for patients receiving treatment other than anti-EGFR has however been insufficiently explored.

CtDNA is often rare in blood circulation and highly diluted in normal DNA (ie. non-mutated or wild-type DNA). In this context, detection techniques based on picoliter droplet-based digital PCR were developed to accurately quantify circulating nucleic acids in plasma and has demonstrated a high sensitivity^{16,17}. Apart from gene mutations, epigenetic modifications have been evaluated in order to facilitate identification of ctDNA, such as the hypermethylation of specific genes involved in colorectal carcinogenesis^{18,19}. Recently, ctDNA detection based on hypermethylation of *WIF1* and *NPY* genes using picoliter droplet-based digital PCR has been considered as a potential universal plasmatic biomarker in CRC both in localized and metastatic diseases²⁰.

In this study, using picoliter droplet-based digital PCR quantitative analysis of mutated or hypermethylated alleles, we investigated the pertinence of plasmatic ctDNA concentration in determination and monitoring both as a prognostic marker and an early predictive marker of treatment efficacy in patients receiving chemotherapy for mCRC.

Material and Methods

Study design

This prospective single-center study was performed at the European Georges Pompidou hospital (Paris, France) and enrolled all consecutive patients with histologically proven mCRC receiving a first- or second-line chemotherapy between October 2012 and July 2015. This study (NCT01983098) received ethical approval from the "Ile-de-France ethics committee" (ID CRB: 2013-A00680-45) and all patients provided written informed consent.

Analyzed blood samples were prospectively collected from patients before the first cycle (at baseline, C_0), and then before the second (at two weeks, C_1) and/or third cycle (at four weeks, C_2) of chemotherapy. Analysis of ctDNA at baseline was based either on detection of mutation previously

highlighted in tumor tissue or, when no mutation were detected in tumor tissues or no droplet-based digital PCR assay was available for the detected mutation(s), on *WIF1* or *NPY* genes hypermethylation. Carbohydrate antigen (CEA) serum levels and computed tomography (CT) scans of the chest, abdomen and pelvis were performed at baseline and then every 8 weeks during treatment (or earlier in patients with suspected disease progression). CT scans were centrally reviewed by a single radiologist to document response to treatment according to the RECIST criteria, version 1.1. This evaluation was conducted blindly from ctDNA results.

Identification of somatic mutations in tumor tissue.

Tumor DNA was extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues using the Maxwell® 16 MDx Research Instrument (Promega Corporation, Fitchburg, United-States) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration was measured with a Qubit 2.0 fluorimeter (Invitrogen) using the dsDNA BR Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, United-States). Molecular analysis was carried out by real-time PCR using TaqMan® probes (Applied Biosystems) for the 7 most frequent mutations of *KRAS* (c.34G>A/ p.G12S, c.34G>C / p.G12R, c.34G>T / p.G12C, c.35G>A / p.G12D, c.35G>C / p.G12A, c.35G>T / p.G12V and c.38G>A / p.G13D). If no mutation was identified at this step, NGS analysis of the DNA from tissues was performed. Tumor DNA (10 ng) was amplified by PCR using the Ion AmpliSeq[™] Colon Lung Cancer Panel v2 and the Ion AmpliSeq[™] Master Mix v2.0 (Ion Torrent, Life Technologies) using the manufacturer's protocol. The multiplexed amplicon library concentration and size was determined using an Experion[™] DNA analysis kit (Bio-Rad Laboratories Inc.). Samples were barcoded using Ion Xpress Barcode Adapters Kit according manufacturer's instructions (Ion Torrent, Life Technologies) and multiplexed for emulsion PCR. Sequencing was performed using the Ion 318 Chip on a Personal Genome Machine Sequencer (PGM, Ion Torrent, Life Technologies). Results were analyzed using Ion Torrent Brother Software (version 3.4).

Isolation and quantification of circulating tumor DNA.

Plasma was separated from the cellular fraction by centrifugation at 3,000g (4°C) after blood collection in EDTA tubes (about 7,5 mL), and stored frozen at -80°C prior to DNA extraction. Before extraction, plasma samples were centrifuged for 10 min at 3,000g. Plasma DNA was extracted using the QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) from 2 to 3 mL of sample according to the manufacturer's instructions. The quantity of DNA was measured by Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, Life Technologies) using the dsDNA HS Assay (Invitrogen). Extracted DNA samples were stored frozen at -20°C before testing.

Quantification of circulating mutated or hypermethylated DNA.

CtDNA detection was performed using mutation analysis when real time PCR or NGS analysis of the tumor tissue highlighted the presence of a mutation for which a digital PCR assay was previously developed^{15,21}. This includes mutations in *KRAS* (c.34G>A/ p.G12S, c.34G>C / p.G12R, c.34G>T / p.G12C, c.35G>A / p.G12D, c.35G>C / p.G12A, c.35G>T / p.G12V and c.38G>A / p.G13D, c.180_181TC>AA / p.Q61K; c.436G>A / p.A146T), *BRAF* (c.1799T > A/p.V600E) or TP53 (c.743G>A / p.R248Q, c.524G>A / p.R175H). In other cases ctDNA detection was performed using an assay targeting *WIF1* hypermethylation. Negative samples were analyzed with an assay targeting *NPY* hypermethylation. Follow-up samples were analyzed using the same assay than baseline samples.

Preparation of the assay reaction for the detection of mutated or hypermethylated circulating DNA.

The duplex assays allow the parallel amplification of wild-type and specific mutant/hypermethylated sequences. For methylation assays, DNA was bisulfite converted as described previously²⁰. In a pre-PCR environment, a mixture of PCR reagents was prepared, with 12.5µL Master Mix (Taqman Genotyping, Life Technologies / Kapa probe Fast qPCR master mix, Kapa Biosystems) and assay solution containing 0.75µL 40mM dNTP Mix (New England BioLabs), 0.5µL 25mM MgCl2, 1µL 25x Droplet Stabilizer (RainDance Technologies, Billerica, US), 1.25µL 20x Taqman® Assay Mix containing 16 µM/8 µM of forward and reverse primers, 4µM of 6-FAM and 4µM/12µM of VIC Taqman® labeled-

probes (the sequences of primers and probes are given in Perkins *et al*²⁰ and target DNA template to a final reaction volume of 25μ L. When using Competitive Allele-Specific TaqMan® (castPCRTM) technology for the *TP53* mutation detection, each probe was added separately: 1.25 μ L to 2.5 μ L in the final reaction volume from a 10x provided tube (Life Technologies).

Picoliter droplet-based digital PCR for the quantification of circulating DNA.

Each 25µL reaction was loaded on a microfluidic chip (containing 8 parallel wells) to proceed to the emulsion generation (Raindance Technologies, Billerica, US). During this step, samples are compartmentalized into millions of picoliter droplets. The emulsions are retrieved and thermally cycled (Biorad C1000/S1000) as followed: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C (using a 0.6°C/second ramp rate), followed by 44 cycles of: 95°C, 15 s and 60°C, 1 min (using a 0.6°C/min ramp rate), with a ultimate step of 10 min at 98°C. After completion, the emulsions were either stored at 4°C or processed immediately to measure the end-point fluorescence signal from each droplet using the RainDrop Digital PCR Sense (Raindance Technologies, Billerica, US). Data were analyzed using the Raindrop Analyst software as described by the manufacturer. Depending on the probe, a green or red fluorescence is emitted when mutant/hypermethylated or wild-type DNA template is present. Populations are clustered according to this fluorescence level, allowing to precisely count tumor and normal DNA molecules. The concentration of ctDNA can be deduced as well as the ratio of mutant/hypermethylated over wild-type DNA.

Data analysis

For each sample, considering that a haploid genome equivalent is contained in a positive droplet, DNA concentrations were calculated by taking into account the volume of extracted plasma mL, the elution volume following plasmatic DNA extraction, the volume of DNA analyzed.

A limit of blank (LOB, i.e. a number of false positive events in digital PCR testing) was previously determined for each assay used in the study (*KRAS*, *BRAF*, *TP53*, *WIF1*, *NPY*)^{20,15}. When the number of positive droplets was above the LOB, the samples were considered as positive and a ctDNA concentration was calculated (when the LOB was superior to the number of positive droplets in the sample, the concentration of ctDNA in plasma was zero).

Statistical analysis

All analyses were carried out with a bilateral alpha type 1 error of 5%. Data were described as frequencies (percentages) or means and medians (range). The Fisher exact test was used to compare distributions of qualitative and ordinal variables.

Disease assessment was performed every 8 weeks until documented progression. Response was assessed according to RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) criteria, version 1.1. Progression-free survival (PFS) was defined as the time elapsed from the first cycle of chemotherapy until the date of first progression or death (all causes), whichever came first. Surviving patients without disease progression were censored at the last follow-up date. Overall survival (OS) was defined as the time elapsed from the first cycle of chemotherapy until death (all causes). Surviving patients were censored at the last follow-up date. Survival curves were drawn with the Kaplan–Meier method and compared with the log rank test.

The variation of ctDNA concentration between cycle 1 at baseline (ctDNA, C₀) and cycle 3 (at week 4) or cycle 2 (at week 2 if blood sample at week 4 was not available) (ctDNA, C_{2or1}) was correlated with the better objective response rate (ORR), PFS and OS.

An unstratified Cox regression model was used to estimate hazard ratios (HRs) with 95% confidence intervals. Multivariate analyses were adjusted on age, gender, ECOG performance status (PS), metastatic synchronicity and treatment line. When performing survival analyses to evaluate the impact of ctDNA concentration during treatment, an adjustment on the cycle of plasma collection was applied (cycles C_1 or C_2). Analyses were performed using Stata and R Survisc package. P values <0.05 were considered to indicate statistical significance.

Results

Patients' characteristics

A total of 82 patients with mCRC were included in this study (male, 59.8%; median age, 67.6 years; ECOG PS 0-1, 82.7%). These patients were included before first (82.9%) or second (17.1%) line of chemotherapy with cytotoxic drugs alone (62.2%) or combined with targeted therapy (37.8%). The primary tumor site was located in proximal colon, distal colon and rectum in 36.6%, 40.2% and 23.2%, respectively. The other patients' characteristics at baseline are summarized in **Table 1**.

Circulating tumor DNA detection at baseline

Among the 82 patients tested, 63 patients (76.8%) have detectable ctDNA at baseline. No significant difference was observed in the frequency of positive ctDNA detection between samples analyzed by assays targeting either mutations (N=43) or methylation (N=39). Indeed, among the 43 patients with *KRAS* (n=37), *TP53* (n=3) or *BRAF* mutations (n=3) identified in tumor tissue, 36 (83.7%) patients have an identical mutation detectable at baseline in plasma, while for the 39 remaining patients, plasmatic ctDNA analyzed by *WIF1* or *NPY* hypermethylation was positive in 27 cases (69.2%) (p=NS).

Prognostic impact of ctDNA at baseline

Concentration of ctDNA at baseline was significantly higher for patients with synchronous versus metachronous metastatic disease (P=0.002), as well as for patients with ECOG PS 2-3 versus ECOG PS 0-1 (P=0.02) (**Table 2**). Adjustments on these 2 variables were performed in addition to age, gender and treatment line for the following analyses. No significant difference was observed for the other clinical and biological variables tested (**Table 2**).

We observed that the ctDNA concentration at baseline recorded as a continuous variable was significantly associated with shorter OS after adjustment (HR=1.01 Cl_{95%}[1.0052-1.018], p=0.0003). We divided the population in 3 groups according to the ctDNA concentration at baseline. No significant difference was observed between patients whom ctDNA concentration was below or equal to 0.1 ng/mL (n=31) and those with a ctDNA concentration comprised between 0.1 and 10 ng/mL (n=36) (HR=0.79; Cl_{95%}[0.35-1.8]; P=0.58). However, patients with ctDNA above 10 ng/mL (n=15) had a significantly shorter OS in comparison with the reference group (ctDNA≤0.1ng/mL) (HR=5.64; Cl_{95%}[2.5-12.6]; P<0.0001) (**Figure 1**). The median OS was 33.4, 36.8 and 6.8 months for patients with ctDNA concentration at baseline below 0.1 ng/mL, between 0.1 and 10 ng/mL and above 10 ng/mL, respectively. In multivariate analyses, a ctDNA concentration above 10 ng/mL remained significantly associated with a short OS (HR=3.36; Cl_{95%}[1.3-8.6]; P=0.01) (see **Table 2**).



Figure 1. Impact of baseline ctDNA concentration on overall survival (OS). Three groups of patients were discriminated according to ctDNA baseline concentrations: below 0.1ng/mL, in the range 0.1-10 ng/mL and above 10 ng/mL.

Predictive impact of ctDNA variations on treatment efficacy

Evaluation of ctDNA was performed just before the 3rd cycle of chemotherapy (C₂). In 16 cases this sample was missing, and we used the sample collected just before the second cycle (C₁). In 9 cases the 2 samples were missing. Among these 73 evaluable patients, we compared ctDNA concentration between C₀ and C_{2or1}, and observed a decrease ctDNA concentration for 44 patients, whereas for 22 patients no ctDNA was detected in both C₀ and C_{2or1} and were considered as stable. Based on the C_{2or1} ct DNA concentration and the variation from C₀ we classified the patients in 3 groups. These groups correspond to (i) patients with a ctDNA concentration remaining or decreasing below 0.1 ng/mL at C_{2or1} ("D_{<0.1ng/mL}", n=40, **Figure 2, panel A**), (ii) patients with ctDNA concentration decreasing but remaining above 0.1 ng/mL at C_{2or1} ("D_{<0.1ng/mL}", n=26, **Figure 2, panel B**), and (iii) those with ctDNA concentration increasing at C_{2or1} ("I_{≥0.1ng/mL}", n=7, **Figure 2, panel C**). The patients' survival according to these groups was studied.



Figure 2. Profiles of patients in the PLACOL cohort depending on the ctDNA variations between C_0 and C_{2or1} .

In univariate analysis, the D_{<0.1ng/mL} patients group had a significant better PFS and OS than the D_{≥0,1ng/mL} patients group (PFS: HR=2.22, CI 1.18-4.16, P=0.013; OS: HR=2.85, CI 1.38-5.89, P=0.004), and significant better PFS than the I_{≥0.1ng/mL} group (PFS HR=3.71, CI 1.46-9.45 P=0.006; OS HR=2.95, CI 0.84-10.34 P=0.09) (see **Figure 3, PFS (A) and OS (B) curves**). The median PFS and OS were respectively 8.6 and 36.8 months for D_{<0.1ng/mL}, 6 and 13 months for D_{≥0,1ng/mL} and 2.8 and 14 months for I_{≥0.1ng/mL} groups.



Figure 3. Progression Free Survival (PFS, panel A) and Overall Survival (OS, Panel B) curves according to variations of ctDNA concentrations.

In multivariate analysis, patients who had a ctDNA concentration inferior to 0.1ng/mL at C_{2or1} (D_{<0.1ng/mL} group) remained with a significant longer PFS than patients having a ctDNA concentration decreasing and remaining superior or equal to 0.1ng/mL at C_{2or1} (D_{>0.1ng/mL} HR=2.3, Cl 1.2-4.7 P=0.02) and than patients with an increasing concentration (I_{≥0.1ng/mL} HR=3.6 Cl 1.3-10.0 P=0.01) (Table 3). No significant difference was observed in OS between these 3 groups (**Table3**). Such results demonstrate the main influence on prognosis of reaching and passing below a negligible ctDNA threshold (0.1 ng/mL) rather than observing a decrease alone.

In order to test the clinical interest of an early and sharp decrease of the concentration of ctDNA, we evaluated in the $D_{\ge0,1ng/mL}$ group the prognostic impact of the slope of \triangle ctDNA according to the following ratio ($|C_{2or1}-C_0|/C_0|$)*100 named Slope \triangle ctDNA. In an univariate Cox model, we observed a significant decrease in PFS hazard ratio by increasing unit of Slope \triangle ctDNA (HR=0.96 Cl_{95%}[0.92-0.99] P=0.015). The best cut-off of this continuous variable (Slope \triangle ctDNA) was estimated using the log rank test statistic²². The retained value was 80%. The PFS and OS curves according to this cut-off value are given in **Figure 4** (PFS: HR=0.13 Cl_{95%}[0.03-0.54] P=0.005, and OS: HR=0.27 Cl95%[0.08 -0.92]; P=0.04 respectively). We observed also a significant enrichment in tumor response rate in the group of patients with a Slope \triangle ctDNA ≥80% as compared to the group of patients with a Slope \triangle ctDNA <80% (best ORR: 47.1% vs 0%; p <0.03 respectively) (**Figure 6 A**).



Figure 4. Impact on PFS of the decreasing slope of ctDNA concentration decrease (Slope \triangle ctDNA) in the D \ge 0.1ng/mL group.

Finally we created a composite marker based on both ctDNA concentration at C_{2or1} and slope Δ ctDNA. The patients were divided in 2 groups according to this composite marker. Patients with a ctDNA concentration below 0.1 ng/mL at C_{2or1} and those with a slope Δ ctDNA ≥80% were grouped and named "Good ctDNA responder" (n=58), the others were named "bad ctDNA responder" (n=15). In comparison with "bad ctDNA responder" patients, those belong the "good ctDNA responder" group has a longer median PFS (8.5 vs 2.4 months; HR=0.19, Cl95%[0.09-0.40], P<0.0001) and OS (27.1 vs 11.2 months; HR=0.25, Cl95%[0.11-0.57], P<0.001) (**Figure 5 A and B**). These results remained significant after adjustment for age, gender, treatment line, ECOG PS, metastatic synchronicity and the use of C1 or C2 for ctDNA measurement either for PFS (HR=0.21, Cl95%[0.09-0.45], P<0.0001) and OS (HR=0.35, Cl95%[0.14-0.86], P=0.02). All patients who experienced an objective tumor response belong to the good ctDNA responder group as defined by the composite marker (**Figure 6B**). In contrast, among the 16 patients with progression disease at the first evaluation, 50% of them belong to the bad ctDNA responder group (p< 0.001).



Figure 5. Impact on PFS (A) and OS (B) of the slope of ctDNA concentration decrease (Slope \cdot ctDNA) in bad and good responders groups.



Figure 6. Changes in RECIST scores (y axis, %) in patients in the $D_{\ge 0.1 ng/mL}$ group according to the decreasing slope of ctDNA concentration (red:<80%; blue:≥80%) (A) or bad/good responder groups according to the composite marker (red: bad responder group; blue: good responder group) (B).

Discussion

In our series, ctDNA baseline concentrations vary in a broad range from 0 to 300 ng/mL. In previous published series, total circulating DNA concentration has been reported to be higher in patients with CRC than in healthy people, but also in patients with advanced cancers as compared with patients with localized ones²³. The amount of tumor-derived DNA in the circulation was thus suggested as being representative of tumor burden (Tie annals). This relationship is challenging to be firmly demonstrated owing to the difficulty to precisely measure, with radiographic imaging, the size of primary and metastatic tumor sites. Some associations were suggested between clinical parameters, potential surrogates of tumor burden, and the ctDNA concentration at baseline. In our study, median ctDNA concentration at baseline was significantly higher in patients whom ECOG PS is 2-3 in comparison with others (ECOG PS 0-1 patients) and also in case of synchronicity of metastases (p=0.002) as compared to metachronous ones.

Circulating tumor DNA concentration at baseline is a prognostic marker of clinical outcome in mCRC patients when considered as a continuous variable and adjusted for prognostic factors. Furthermore, patients with ctDNA baseline concentration higher than 10 ng/mL had a shorter median PFS and OS than the others. These results are in agreement with previously reported studies^{24,25}. The value of the ctDNA concentration threshold depends on patient population included in the different series; around 20 ng/ml for patients tested before 2nd line of chemotherapy and, around 35 ng/mL for patients having received all approved standard therapy before ctDNA concentration measurement.

Moreover we showed that early variations in ctDNA concentration could be a surrogate maker of treatment efficacy in colorectal tumor and may be a pertinent tool for treatment tailoring. We demonstrated that early changes of the ctDNA concentration could predict PFS of mCRC patients starting a first- or second-line chemotherapy. The patients were grouped according to ctDNA concentration behavior under treatment. Three groups were defined based on a decreasing or an increasing ctDNA concentration and a residual threshold (0.1ng/mL) of ctDNA concentration for those having a decrease of ctDNA. This classification is a prognostic factor for PFS. One group seems to have an intermediate prognosis (i.e. patients belonging to the decreasing ctDNA concentration but not reaching the threshold of 0.1ng/mL group). In this group we observed that an early decrease above 80% in ctDNA concentration was associated with significant longer PFS and OS than those who have a decrease under 80%. Similar results were observed with a threshold of 90% in a series of 53 metastatic patients¹². Based on these results, a composite marker was defined combining the threshold of 0.1 ng/mL for ctDNA concentration and the threshold of 80% for ctDNA concentration decrease slope before second or third chemotherapy cycle. According to this composite marker, patients' population was divided in bad or good ctDNA responder and the latter group was associated with a better tumor response rate, and a longer PFS and OS in multivariate analysis.

Monitoring ctDNA concentration levels usually requires prior identification of somatic alterations in tumor. In this study ctDNA concentration measurement was performed based on digital PCR assays using specific probes targeting specific tumor mutations in 52.4% of the patients. For the remaining patients, an alternative strategy was used based on the detection of hypermethylation of two genes *WIF1* and *NPY*, as previously described^{20,26}. In this previous work, an hyperymethylation of *NPY* or *WIF1* genes was present in 94.3% of tumor tested²⁰. This high rate of positivity allowed the monitoring mCRC patients without knowing the mutational status of the tumor. In our series, the follow-up of ctDNA concentration was performed using hypermethylation assays in 47.6% of the patients.

In our results, 69.2% of the samples of patients followed by hypermethylation were positive at baseline. Regarding this limited sensitivity of detection, we tested whether measuring the hypermethylation had induced a bias in our study. At the first sampling (before treatment), there was no difference between the proportion of positive patients for the presence of ctDNA detected by mutation and the proportion of patients whom ctDNA was detected by hypermethylation. In addition, when the concordance tumor/ctDNA was assessed, there was no difference between the number of patients negative for the presence of ctDNA whom tumor was positive for a given mutation, and patients whom ctDNA was tested for hypermethylation. Such results confirm that no bias was induced by the detection of either the mutation or hypermethylation. In our study, tumors were not tested for the hypermethylation of *WIF1* and *NPY*, it would be relevant to assess the tumor methylation status in a future work.

In mCRC, it has been suggested that mutated *RAS* allele(s) could emerge in circulating DNA when a resistance to anti-EGFR treatment appears and decline when a new effective chemotherapy is introduced. This strategy is restricted to patients receiving anti-EGFR therapy, which implies to track the emergence of mutated *RAS* alleles that do not appear earlier from the resistance/progression disease^{29,30}. It thus requires several ctDNA sampling and analyses of ctDNA during the therapy.

Recently, Tie *et al.* have evaluated ctDNA as a marker of therapeutic efficacy in a prospective cohort of 52 mCRC patients receiving first-line chemotherapy¹². A significant reduction of ctDNA level (10-fold) between baseline and before the second cycle (14-21 days) of chemotherapy was significantly associated with tumor response based on RECIST criteria evaluated at 8-10 weeks. Major (\geq 10-fold) versus lower (<10-fold) reductions in ctDNA concentration at the second cycle of chemotherapy were associated with a trend for a better PFS but not with OS.

In previous studies, ctDNA was mostly evaluated at baseline and/or as a differential between 2 time points. In this study, the threshold value 0.1ng/mL appeared as a strong prognostic cut-point value²². Beside this, there is the need for understanding the ctDNA dynamic under treatment. The slope of decrease in patients whom ctDNA variations did not show a normalization profile is a kinetic parameter that has not been demonstrated before. The composite marker, as defined in our study, could be further tested in future works. It suggests that determining the kinetics of ctDNA variations could permit to early refine treatment.

Some limitations can be highlighted in our study. Results should be interpreted with cautiously given the modest sample size of patients included in this prospective study. However, our major finding on predictive impact in therapeutic efficacy of early changes in ctDNA concentration seems robust due to the high HR despite adjustment on other prognostic factors. Another limitation is that we analyzed ctDNA concentration only for sample collected at C_1 and/or C_2 .

In conclusion, the ability to assess early and reliably the non-response to treatment with serial ctDNA concentration analysis may be of benefit for patients due to the possibility to switch earlier to

alternative therapy and to minimize the side-effects of an inefficient therapy, notably for patients with non-measurable disease. Our study showed that patients who do not experienced an "early normalization" (below 0.1 ng/mL) or "early decreasing slope above 80%" of ctDNA concentration have a lesser benefit from chemotherapy. Prospective clinical trials including serial ctDNA analysis are ongoing in order to validate this promising early predictive marker of therapeutic efficacy for mCRC. Such results suggest that ctDNA concentration at baseline could provide more specific information than conventional markers (ie. RECIST, seric markers) for prognosis of mCRC patients

Acknowledgments

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Université Paris-Descartes, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Institut National du Cancer (INCA, n° 2009-1-RT-03-US-1 and 2009-RT-03-UP5-1), the Association pour la recherche contre le cancer (ARC, no. SL220100601375), the Agence Nationale de la Recherche (ANR Nanobiotechnologies; no. ANR-10-NANO-0002-09), the SIRIC CARPEM, the ligue nationale contre le cancer (LNCC) and Advanced Merieux Research Grant (PLP and VT) and canceropole funding (no. 2011-1-LABEL-UP5-2). FG thanks the Fondation Servier for a fellowship within the Frontiers in Life Science PhD program (FdV).

Tables

Table 1: Patients	' characteristics	and ct DNA	concentration	at baseline
--------------------------	-------------------	------------	---------------	-------------

	N (%)	median ctDNA [IQR]	P value
All patients	83	0.38 [0.02-7.73]	
Age years (Mean)	64.6 ± 12.0		
Median age [range]	67.6	[35.0 - 90.7]	
Age group			
<65	35 (42.7)	1.39 [0.02-8.78]	
65+	47 (57.3)	0.36 [0.02-5.96]	0.52
Gender			
Male	49 (59.8)	0.40 [0-9.13]	0.87
Female	33 (40.2)	0.36 [0.05-5.17]	
ECOG PS (n=81)			
0-1	67 (82.7)	0.36 [0.01-4.8]	0.02
2-3	14 (17.2)	8.09 [0.34-57.6]	
Primary tumor site			
Proximal colon	30 (36.6)	0.41 [0.02-8.32]	
Distal colon	33 (40.2)	0.36 [0.01-9.13]	
Rectum	19 (23.2)	0.36 [0.01-4.07]	0.78
Synchronicity of meta	istases		
Metachrone	19 (23.2)	0.03 [0-0.41]	
Synchrone	63 (76.8)	1.65 [0.05-9.50]	0.002
Number of metastatic site(s)			
1	40 (48.8)	0.38 [0.02-6.84]	0.77
2	25 (30.5)	0.36 [0-8.71]	
≥ 3	17 (20.7)	0.85 [0.13-6.85]	
Line of chemotherapy	at inclusion		
First-line	68 (82.9)	0.36 [0.02-6.78]	0.64
Second-line	14 (17.1)	1.12 [0.02-37.5]	
Chemotherapy regime	en		
Chemotherapy	51 (62.2)	1.65 [0.02-8.99]	0.15
Chemotherapy +targeted therapy	31 (37.8)	0.32 [0.012-1.65]	
CEA U/mL (n=76)			
<10 N	40 (52.6)	0.38 [0.02-5.43]	0.31
≥10 N	36 (47.4)	1.73 [0.06-9.18]	

Variable	Hazard Ratio*	Cl95% [inf-sup]	P value
ctDNA concentration (ng/mL)			
<0.1	1		
0.1-10	0.66	[0.27-1.61]	0.36
> 10	3.36	[1.31-8.60]	0.01
Gender			
Female	1		
Male	1.04	[0.50-2.16]	0.91
Age (years)			
≥65	1		
<65	0.72	[0.33-1.59]	0.42
ECOG PS**			
0-1	1		
2-3	3.58	[1.56-8.23]	0.00268
Treatment Line			
1	1		
2	1.795	[0.75-4.27]	0.19
Synchonicity	-		
Metachronous	1		
Synchronous	2.70	[0.87-8.34]	0.08

Table 2. Prognostic value ctDNA concentration at baseline on overall survival adjusted on gender, Age, ECOG PS, treatment line, metastatic synchronicity.

Table 3. Impact on progression free survival and overall survival of ctDNA variations observed between C_0 and C_{2or1} and adjustment on variables.

	Progression Free Survival		Overall Survival			
Variable	Hazard	CI95%	P value	Hazard	CI95%	Р
	Ratio*	[inf-sup]		Ratio*	[inf-sup]	value
ctDNA group						
D≤0.1ng/mL	1			1		
D≥0.1ng/mL	2.28	[1.12 - 4.66]	0.02	1.99	[0.90 - 4.38]	0.09
l≥0.1ng/mL	3.62	[1.30 -	0.01	2.26	[0.59 - 8.63]	0.23
		10.04]				
Gender						
Female	1			1		
Male	1.27	[0.70 - 2.31]	0.43	1.23	[0.58 - 2.58]	0.59
Age (years)						
≥65	1			1		
<65	0.90	[0.49 - 1.66]	0.73	0.77	[0.33 - 1.78]	0.54
ECOG PS**						
0-1	1			1		
2-3	1.47	[0.69 - 3.17]	0.32	2.86	[1.24 - 6.63]	0.01
Treatment Line						
1	1			1		
2	1.50	[0.75 - 3.00]	0.25	2.06	[0.82 - 5.17]	0.12
Synchronicity						
Metachronous	1			1		
Synchronous	1.16	[0.54 - 2.47]	0.70	2.94	[0.93 - 9.32]	0.07
C _{2or1} ***						
C ₁	1			1		
C ₂	0.91	[0.46 - 1.78]	0.78	0.94	[0.37 - 2.42]	0.91

*HR=1 for reference variable in the Cox test

**Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status

***adjustment on time point of ctDNA measurement

Supplemental Figures.



Supplemental Figure 1. Workflow of the clinical study PLACOL enrolling N=82 mCRC patients.
References

- 1. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359-86 (2014).
- 2. Van Cutsem, E. *et al.* ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* **27**, 1386–422 (2016).
- 3. Eisenhauer, E. A. *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer* **45**, 228–47 (2009).
- 4. Sharma, M. R., Maitland, M. L. & Ratain, M. J. RECIST: no longer the sharpest tool in the oncology clinical trials toolbox---point. *Cancer Res.* **72**, 5145–9; discussion 5150 (2012).
- 5. Zhao, B. *et al.* Variability in assessing treatment response: metastatic colorectal cancer as a paradigm. *Clin. Cancer Res.* **20**, 3560–8 (2014).
- 6. Sørbye, H. & Dahl, O. Carcinoembryonic antigen surge in metastatic colorectal cancer patients responding to oxaliplatin combination chemotherapy: implications for tumor marker monitoring and guidelines. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4466–7 (2003).
- 7. Goldstein, M. J. & Mitchell, E. P. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest.* **23**, 338–51 (2005).
- 8. Bettegowda, C. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6**, 224ra24 (2014).
- 9. Ray, K. Colorectal cancer: Liquid biopsy enables real-time monitoring of molecular alterations in CRC. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 372 (2015).
- 10. Dawson, S.-J. *et al.* Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1199–209 (2013).
- 11. Lièvre, A. *et al.* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992–5 (2006).
- 12. Tie, J. *et al.* Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* **26**, 1715–22 (2015).
- 13. Siravegna, G. *et al.* Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat. Med.* **21**, 795–801 (2015).
- 14. Diaz, L. A. *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* **486**, 537–40 (2012).
- Laurent-Puig, P. *et al.* Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin. Cancer Res.* 21, 1087–97 (2015).
- 16. Taly, V. *et al.* Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect KRAS Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. *Clin. Chem.* **59**, 1722–1731 (2013).
- 17. Taly, V., Pekin, D., El Abed, A. & Laurent-Puig, P. Detecting biomarkers with microdroplet technology. *Trends Mol. Med.* **18**, 405–16 (2012).
- 18. Li, M. *et al.* Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat. Biotechnol.* **27**, 858–63 (2009).
- 19. Garrigou, S. *et al.* A Study of Hypermethylated Circulating Tumor DNA as a Universal Colorectal Cancer Biomarker. *Clin. Chem.* (2016).
- 20. Garrigou, S. *et al.* A Study of Hypermethylated Circulating Tumor DNA as a Universal Colorectal Cancer Biomarker. *Clin. Chem.* (2016). doi:10.1373/clinchem.2015.253609
- 21. Taly, V. *et al.* Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect KRAS Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. *Clin. Chem.* (2013). doi:10.1373/clinchem.2013.206359

- 22. Mandrekar, J. N. Statistics and Data Analysis Cutpoint Determination Methods in Survival Analysis using SAS ® Mandrekar J . N ., Section of Biostatistics , Mayo Clinic , Rochester , MN Mandrekar S . J ., The Ohio State University , Columbus , OH Cha S . S ., Section of Bi. 1–5
- 23. Bettegowda, C. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6**, 224ra24 (2014).
- 24. Tabernero, J. *et al.* Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet. Oncol.* **16**, 937–48 (2015).
- 25. Spindler, K.-L. G. *et al.* Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *Int. J. cancer* **135**, 2984–91 (2014).
- 26. Roperch, J.-P. *et al.* Aberrant methylation of NPY, PENK, and WIF1 as a promising marker for blood-based diagnosis of colorectal cancer. *BMC Cancer* **13**, 566 (2013).

CHAPITRE B.II. ENJEU DE LA DETECTION DE L'ADN TUMOTAL CIRCULANT CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE MELANOME METASTATIQUE

B.II.1. SUIVI DES VARIATIONS DE L'**ADN**TC DANS LE CADRE DE L'ETUDE DE LA RESISTANCE VEMURAFENIB.

Introduction et objectif du projet

Les enjeux de la recherche sur le mélanome

Les enjeux relatifs à la recherche sur le mélanome sont importants. Les principales raisons sont l'incidence en augmentation de cette maladie, et le pronostic dès lors que le cancer a évolué vers le stade métastatique. D'après l'OMS, 132 000 nouveaux cas sont enregistrés chaque année dans le monde. Avec environ 11 176 nouveaux cas estimés en France en 2012 dont 48% survenant chez l'homme, le mélanome représente 3,1% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers estimés en 2012³⁴⁰, ce qui le place au 11^{ème} rang en termes de fréquence, tous sexes confondus. La mortalité liée au mélanome est également en augmentation, mais à un rythme plus lent que son incidence.

Lorsque le mélanome est localisé, plus de 85% des patients guérissent suite à une exérèse chirurgicale. Le taux de guérison chute dramatiquement dans les formes plus avancées avec un taux de survie moyen à cinq ans de 40 % pour les stades III (classification AJCC) avec une invasion lymphatique ³⁴¹. Dans la maladie métastatique (stade IV AJCC), le taux de guérison est inférieur à 50 % à 1 an. Plusieurs facteurs cliniques (âge, localisation, nombre de ganglions lymphatiques envahis et/ou présence de métastases à distance) et histopathologiques (profondeur de tumeurs, présences d'ulcérations, taux de division mitotique) sont utilisés comme facteurs pronostiques³⁴¹.

Emergence de thérapies ciblées

En terme thérapeutique, des immunothérapies basées sur l'utilisation de l'interféron ou de l'interleukine-2 ont été développés, bien qu'en plus de 20 ans, une seule thérapie ait été mise sur le marché (Proleukin, IL2, 1990 en Europe), Ces traitements sont peu efficaces dans le cas de cancers métastatiques³⁴². En effet, dans de nombreux de cas, le mélanome évolue vers la forme métastatique ou a été détecté après l'apparition de métastases. Celles-ci peuvent être localisées sur la peau (métastases régionales, stade III) ou encore à distance par exemple aux poumons, au cerveau, dans les os. Depuis 2005, de nouvelles approches sont en cours d'évaluation³⁴³. En 2009, la participation aux essais cliniques est devenu pratique courante dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de mélanome métastatique ³⁴⁴. Des molécules ont émergé telles que l'ipilimumab, le pembrolizuab ou nivolumab, des inhibiteurs de l'expression de BRAF muté, comme le vemurafenib ou le dabrafenib.

Le vemurafenib est un médicament anti-cancéreux d'administration orale réservé aux patients adultes atteints d'un mélanome, porteurs des mutations du gène *BRAF* (p.V600E), impliqué dans les processus de division et de prolifération cellulaire. Il agit en bloquant la protéine BRAF qui se retrouve suractivée spécifiquement dans les cellules cancéreuses lorsque la mutation est présente. Ce traitement a obtenu une autorisation de mise sur le marché en décembre 2011, il est le premier à cibler le gène *BRAF* muté. Dans le mélanome, plus de 70 % des tumeurs présentent une mutation de

ce gène ²⁶⁹. Dans les essais cliniques, le vemurafenib a induit une réponse partielle ou complète chez plus de 80 % des patients atteints d'un mélanome présentant une mutation *BRAF* p.V600E. Cependant, dans de nombreux cas, une résistance émerge et la maladie progresse. Dernièrement, les mutations somatiques de la voie de signalisation MAPK ont été identifiées comme activatrice de cette résistance.

Depuis, des inhibiteurs de MEK, tel que trametinib³⁴⁵, sont désormais administrés en combinaison de l'inhibiteur de BRAF. Etant donné la forte prévalence de mutations *BRAF* dans divers types de cancer, il est d'intérêt de comprendre les mécanismes sous-jacents de résistance et la pharmacologie relative à l'efficacité des traitements anti-BRAF.

Intérêt du suivi de la concentration en vémurafenib

Devant le manque d'efficacité thérapeutique du vémurafenib, des études se sont intéressées à l'utilité du suivi de la concentration de cet agent dans le sang des patients. Cette approche a été envisagée dans le but d'évaluer la valeur pronostique de la concentration plasmatique du traitement.

Dans une étude récente, l'équipe du Pr Nicolas Dupin en dermatologie, et les pharmacologues de l'hôpital Cochin (A.Thomas, B. Blanchet) ont travaillé conjointement sur cette problématique. Ils ont évalué la corrélation entre la cinétique du vémurafenib et l'efficacité du traitement. Un seuil de 40.2 mg/L a été décrit comme ayant une valeur pronostique, signifiant que les patients présentant une concentration en vémurafenib inférieure à cette valeur ne bénéficiaient pas du traitement, bien que subissant la toxicité³⁴⁶.

En parallèle, dans le but de comprendre les phénomènes de résistance au traitement, cette équipe a souhaité étendre son investigation à l'analyse de l'ADNtc, en collaborations avec notre équipe. En effet, le rôle de mutations secondaires était soupçonné, dès lors que des travaux récents avaient démontré l'émergence de mutations de résistance en aval de la voie MAPK (comme *NRAS*). L'objectif était alors de détecter les variations d'ADNtc, et comparer ce marqueur, déjà décrit à de nombreuses reprises dans la littérature, à leurs résultats pharmacologiques. Dans ce contexte, une collaboration a été montée entre cette équipe et le laboratoire hôte, pour quantifier l'ADNtc de manière rétrospective, chez des patients atteints de mélanomes métastatiques présentant une mutation *BRAF* p.V600E.

Marqueurs diagnostiques, pronostiques et prédictifs de l'efficacité thérapeutique : potentiel de la mesure de l'ADN tumoral circulant.

Les biopsies sont utilisées évaluer le stade du cancer, et déterminer le statut mutationnel de l'ADN de tumeur. Cependant, ces biopsies représentent des actes invasifs, potentiellement dangereux pour la santé du patient, et leur information est limitée. En effet, les cellules tumorales sont présentes à différentes localisations spatiales et elles évoluent au cours du temps. Ainsi, l'utilisation de marqueurs circulants s'avère pertinente, et certaines protéines circulantes sont utilisées notamment au moment du diagnostic métastatique. Le marqueur pronostique utilisé en clinique est le LDH en raison de son augmentation en fonction de la charge tumorale dans différents types de cancers, incluant le mélanome³⁴⁷. Sa concentration plasmatique semble être un facteur pronostique indépendant pour les

malades en stade IV³⁴⁸. Ainsi, en raison de son statut pronostique, de sa méthode de détection facile, la concentration sérique de LDH est le seul marqueur moléculaire à avoir été inclus dans la classification actuelle du mélanome de l'AJCC (sixième édition) pour les stades IV de mélanome³⁴⁹. Cependant, la spécificité des dosages de la LDH sont limitée puisque cette protéine peut être détectée dans différents types de cancers^{66,350}.

L'ADN tumoral circulant a été étudié dans de nombreux types de cancers dont le mélanome, et la faisabilité de la détection de l'ADNtc a été prouvée à travers différents travaux^{143,150,199}. Dès lors que des mutations clefs ont été identifiées dans le mélanome, ces biomarqueurs peuvent être mesurés au cours du temps, comme l'ont fait Schreuer *et al.*³⁵¹. Des études ont démontré sa pertinence pour l'évaluation pronostique ainsi que la prédiction d'une récidive³⁵².

En outre, une comparaison de la LDH et l'ADNtc démontre que ce dernier aurait une valeur pronostique et prédictive plus fiable que la LDH⁶⁸. Une étude a démontré l'utilité de quantifier l'ADNtc dans l'évaluation de la réponse au traitement chez des patients recevant des inhibiteurs de *BRAF*^{173,265}. Ainsi, dans le cadre de l'avènement des thérapies ciblées contre les points de contrôle du système immunitaire (« immune checkpoint blockade »), l'ADNtc représente un biomarqueur pouvant donner une réponse prédictive de la réponse au traitement, au regard des biomarqueurs standards³⁵³.

B.II.2. BREVE COMMUNICATION EN PREPARATION

"Relationship between plasmatic circulating tumor DNA and vemurafenib concentrations in patients with advanced melanoma"

Relationship between circulating tumor DNA measurement by picoliter-droplet based digital PCR and vemurafenib plasma concentrations in patients with advanced *BRAF* mutated melanoma

Authors and affiliations

<u>Garlan F.</u>¹, Blanchet B. ², Kramkimel N. ³, Puszkiel A ².; Golmard JL.⁴, Noe G². Dupin N.³, Laurent-Puig P^{1,6}. , Vidal M.^{2,5}., Taly V. ¹, Thomas-Schoemann A. ^{2,5}

¹Université Paris Sorbonne Cité; INSERM UMR-S1147 ; CNRS SNC5014 ; Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Paris, France, équipe labellisée Ligue Nationale Contre le Cancer

²Assistance publique des Hôpitaux de Paris, Unité Fonctionnelle de Pharmacocinétique et Pharmacochimie, Hôpital Cochin, Paris, France

³Assistance publique des Hôpitaux de Paris, Département de Dermatologie, Hôpital Cochin, Paris, France

⁴Assistance publique des Hôpitaux de Paris, Département de Biostatistiques, Hôpital Pitié- Salpétrière, Paris, France

⁵UMR8638 CNRS, UFR De Pharmacie, Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁶Department of Biology, European Georges Pompidou Hospital, AP-HP, Paris, France

Key words

Circulating tumor DNA, *BRAF* mutated advanced melanoma, vemurafenib, picoliter-droplet digital PCR, pharmacokinetics

Abstract

Background. Circulating tumor DNA has been reported as a prognostic marker in melanoma in diverse studies. In patients bearing a *BRAF* p.V600 mutations, vemurafenib treatment demonstrated variable results among studies. We aimed to investigate the relationship between plasma drug concentration and ctDNA quantification.

Patients, material and methods. 11 patients treated with single agent vemurafenib for advanced *BRAF* V600-mutant melanoma were analyzed in a prospective monocentric study. Vemurafenib plasma concentration was measured and ctDNA was extracted from plasma samples. Circulating tumor DNA concentration was evaluated using picoliter-droplet digital PCR coupled to taqman detection probes targeting the *BRAF* p.V600E/K mutation and wild-type *BRAF* sequences.

Results. An inverse correlation between vemurafenib concentration and ctDNA concentrations was demonstrated (p=0.0055). Circulating tumor DNA follow-up was performed in 8 patients and varied consistently with clinical evaluation in 62.5% (N=5/8). In our patients, a decrease in vemurafenib plasma concentration was followed by an increase in ctDNA concentration, prior or simultaneously to disease progression suggesting that plasma underexposure to vemurafenib might induce resistance mechanisms in melanoma patients

Discussion. This study demonstrates the relevance of vemurafenib plasma monitoring during the follow-up of metastatic melanoma patients. Plasma drug monitoring and ctDNA concentrations could be combined to monitor tumor evolution in melanoma patients treated with anti-MEK/anti-BRAF therapies.

Introduction

Vemurafenib is a BRAF kinase inhibitor approved in advanced *BRAF* V600-mutant melanoma¹. However acquired resistance to vemurafenib that occurs within 4–6 months after treatment initiation is an emerging problem that limits its clinical benefit². There is a need for reliable biomarker to precisely monitor the disease and to measure early recurrent disease. In melanoma, lactate dehydrogenase (LDH) is one of the only blood-based biomarker that was associated with a higher disease burden although its lack of specificity^{3,4}. Circulating tumor DNA has emerged as a non-invasive biomarker that could permit a dynamic monitoring of disease evolution. Some studies demonstrated the clinical potential of ctDNA measurement as a useful biomarker of response to BRAF kinase inhibitor in *BRAF* mutated melanoma patients^{5,6}. Recently, different pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) studies have reported a relationship between plasma exposure to vemurafenib and clinical efficacy^{7–9}. These clinical data suggest that a plasma under-exposure could favor the emergence of a resistance to vemurafenib^{8,10}. However, no biological data is available to support this hypothesis. The aim of this exploratory study was to evaluate the relationship between vemurafenib plasma concentration and ctDNA follow-up.

Materials and methods

Patients and processing of samples.

The population represents a subgroup of monocentric prospective study (VEMUMELA)¹¹. Eleven patients treated with single agent vemurafenib for advanced BRAF V600-mutant melanoma were enrolled in Cochin hospital (Paris, France). All patients started vemurafenib the recommended daily dose (960 mg twice daily), except one patient at 480 mg twice daily because of end-stage kidney disease. The investigational review board "Comité de Protection des Personnes - Ile de France" approved the study protocol. Tumor biopsies were tested for the presence of BRAF p.V600E or p.V600K mutations. Patients whom tumor DNA was positive for a *BRAF* mutation provided written informed consent and agreed for the blood sampling in compliance with the ethical principles of the revised Declaration of Helsinki (2008) and with French regulations. At day 15 and every month after treatment initation, blood samples, were collected to measure vemurafenib plasma concentrations by using liquid chromatography¹² and LDH concentrations. Plasma were stored at -80°C to proceed to extraction of plasmatic DNA (QIAamp Circulating Nucleic Acids kit, Qiagen, Hilden, Germany). DNA was eluted in 50 μ L in AVE buffer and stored at -20°C until analysis.

Picoliter-droplet digital PCR.

Picoliter-droplet digital PCR analyses were performed using the raindance machine (Raindance Technologies[™], Billerica, United-States) coupled to Taqman probes (Life Technologies[™], Carlsbad, United-States) to target *BRAF* wild-type and mutant sequences¹³.

Data analysis.

Limit of blank determination.

Normal genomic DNA samples were tested using the assay targeting BRAF p.V600E mutation. A number of false positive events was determined for each test. Accordingly to rare events Poisson's law, the calculation of a lambda value was obtained and a limit of blank was calculated as previously described^{14,15}. The LOB is 3 for the *BRAF* p.V600E picoliter-droplet digital PCR assay. This LOB was deducted from mutant positive droplet counts, leading to a highly accurate and specific results.

Software analysis and concentration calculation.

To analyze picoliter-droplet digital PCR results, the Analyst software was used to count mutant and wildtype templates, to calculate the concentration of mutant and wild-type DNA initially contained in the plasma samples (conversion in ng per mL of plasma). For each value, the LOB was subtracted thus providing an absolute and precise determination of the concentration.

Statistical analysis

A Pearson non-parametric correlation test was performed to evaluate the relationship between ctDNA concentration and vemurafenib dosages. At baseline, the evaluation of the impact of ctDNA concentration was assessed on overall survival (OS). The progression free survival (PFS) was taken as the clinical endpoint evaluation to estimate the relapse time based on RECIST score. Survival analyses were performed with the Cox model.

Results

Demographical and clinical characteristics of the 11 patients are summarized in Table I. At data cut-off, 2 (18.2%) patients were still treated with vemurafenib. The median OS and PFS were 5.0 months (95%CI: [2.5-7.0]) and 4.0 months (95% CI= [2.0-5.0]), respectively.

A total of 68 samples were analyzed by picoliter-droplet digital PCR, resulting in a mean of 6 samples per patients and ranging from 3 to 9 according to patients. At baseline, ctDNA concentration was detectable in 72% (n=8/11) of patients, which is consistent with reported results¹⁶. For 3 patients, no ctDNA was detected at baseline. Baseline concentrations varied from 0 to 3.61 ng/mL, with a mean of 0.61±1.07 ng/mL.

The plasma ctDNA concentration decreased in 88% (=7/8) from day 0 to day 15 after treatment start. During the study follow-up, an increase in ctDNA concentration was detected prior to clinical progression disease in 33% (n=3/9) and simultaneously with progression disease in 22% (n=2/9) (See Supplemental Figure 1). In 2 patients, ctDNA concentration was null during the follow up, and for 2 others, no progression occurred.

Regarding plasma drug exposure, the mean plasma vemurafenib concentration was 49.2 ± 8.2 mg/L over the treatment course (range 9.1-95.3 mg/L).

Statistical analysis showed that ctDNA concentration at baseline was not statistically associated neither with OS (p=0.0625) nor with PFS (p=0.15). Similarly, LDH concentrations were not correlated to neither OS (p=0.32) or PFS (p=0.17). Interestingly, an inverse relationship between plasmatic vemurafenib concentrations and ctDNA concentrations (CctDNA) was found (p=0.0055).

Demographical and clinical				
characteristics	patients (N=11)			
Sex. n (%)				
Female	5 (45.5)			
Male	6 (54.5)			
Age (vears)	60.2 [38.0-77.0]			
Weight (kg)	83.9 [60.0-112.0]			
LDH (U/L)*	70.1 [50.0-814.0]			
CctDNA* (ng/mL)	0.6 [0.0-3.6]			
CccfDNA* (ng/mL)	0.7 [1.8-31.8]			
Histological type. n (%)				
SSM*	5 (45.4)			
Nodular	4 (36.4)			
No precision	2 (18.2)			
ECOG PS score*. n (%)	· · · ·			
0	6 (54.6)			
1	5 (45.4)			
AJCC* stage. n (%)	· · ·			
2	8 (72.7)			
4	3 (27.3)			
Brain metastasis. n (%)	· · ·			
no	8 (72.7)			
yes	3 (27.3)			
Treatment line. n (%)				
1	9 (81.8)			
2	2 (18.2)			
Progression. n (%)				
no	2 (18.2)			
yes	9 (81.8)			
Death. n (%)				
no	3 (27.3)			
yes	8 (72.7)			
Response at M2*** n (%)				
partial response	5 (45.4)			
stable disease	3 (27.3)			
progression	3 (27.3)			
Progression at M2. n (%)				
no	5 (45.4)			
yes	6 (54.6)			
BRAF mutational status. n				
(%)	10 10			
p.V600E	10 (90.90)			
p.V600K	1 (9.10)			

Table 1. Characteristics of patients. *LDH: lactate dehydrogenase. CctDNA: concentration of circulating tumor DNA. CccfDNA: concentration of circulating cell free DNA. ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group performance status. AJCC: American Joint Committee on Cancer. SSM: Superficial Spreading Melanoma; **Quantitative measures are expressed as mean [range]; ***number of patients presenting a clinical response at 2 months of treatment.

Comparison of vemurafenib and ctDNA concentrations to clinical evaluation (imaging) during the follow-up of 3 patients.

Patient A. (Figure 1)

Patient A was a 77 years-old woman with a stage IV metastatic melanoma (hepatic and gastric metastasis who received a first-line treatment by vemurafenib at the recommended daily dose (960 mg twice daily). For this patient, the ctDNA concentration was 0.34 ng/mL at baseline and fell down to zero at day 15 and day 30. In parallel to this decrease, an increase in vemurafenib concentration was observed as expected following treatment initiation. In contrast, vemurafenib concentrations decreased from 81 to 28 mg/mL between D15 and D30 and remained very close to this value at the next measurement. This decrease might be partly due to the vemurafenib dose reduction because of a grade 2 renal failure. Of note, following this event, an increase in ctDNA concentration was observed between day 30 and day 90, to reach 1,8 ng/mL at day 90. Concerning the clinical evaluation, a differentiated response (DR) was noted (lymph node normalization but increase in subcutaneous lesions) at day 60. A disease progression (PD) was observed at day 90 and ctDNA was detected simultaneously with progression disease.



Figure 1. Follow-up of plasmatic circulating tumor DNA concentration (CctDNA, ng/mL) and vemurafenib concentrations (Cvemu, mg/L) in patients A. Administered doses of vemurafenib are indicated (mg/day) under each graph.

Patient B. (Figure 2)

Patient B was a 45 years-old man with a stage IV metastatic melanoma (with ganglionic, hepatic and bone metastasis) who received a stating dose of vemurafenib of 480 mg per day because of an end-stage kidney disease. Vemurafenib initiation at 480mg per day led to low vemurafenib concentration (9.1 mg/mL) at day 15. Concerning ctDNA measurements, he was the only one of our 8 patients to show an increase in ctDNA concentrations at day 15. Indeed, at day 0, a ctDNA concentration of 4 ng/mL was followed by an increase at day 15, reaching more than 8 ng/mL. At days 30 and 60, the ctDNA

concentrations decrease simultaneaously with the increase in vemurafenib dose and concentrations. After day 30, opposite variations in ctDNA and vemurafenib concentrations were observed. A clinical progression of the disease was noted at day 30 with observation of new metastasis. Therefore, low vemurafenib concentration at day 15 led to an immediate increase in ctDNA concentration prior to the early progression event.



Figure 2. Follow-up of plasmatic circulating tumor DNA concentration (CctDNA, ng/mL) and vemurafenib concentrations (Cvemu, mg/L) in patients B. Administered doses of vemurafenib are indicated (mg/day) under each graph.

Patient C. (Figure 3)

Patient C was a 74 years-old woman with a stage 4 M1a (lymph node metastasis only). Circulating tumor DNA was not detected in this patient at baseline, which might be explained by the absence of distant metastasis. Initially, she received a first-line treatment by vemurafenib at the standard dose. A decrease in vemurafenib concentration occurred at day 30, following vemurafenib dose reduction because of grade 2 cutaneous toxicities and hepatic cytolysis. It was followed by an increase in ctDNA concentration observed between day 30 and day 60. Consecutively, vemurafenib concentration increased and was followed by an opposite variation of ctDNA concentration. The clinical evaluation indicates a partial response (PR) during treatment, followed by a progression (PD) that was detected at day 30. Therefore, the increase in ctDNA concentration was detected prior to clinical progression disease (ganglionic and cerebral metastasis). Interestingly, the ctDNA concentration at day 120 was close to 2 ng/mL, despite a negative value at day 0, suggesting that ctDNA release is representative of metastasis burden. It is important to note that for this patient, each decrease in vemurafenib concentration was followed by an increase in ctDNA concentration.



Figure 3. Follow-up of plasmatic circulating tumor DNA concentration (CctDNA, ng/mL) and vemurafenib concentrations (Cvemu, mg/L) in patients C. Administered doses of vemurafenib are indicated (mg/day) under each graph.



Figure S1. Profiles of variations in ctDNA (blue) and vemurafenib (grey) concentrations for the eight patients whom related data were not presented in the short communication.

References

- 1. Davies, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954 (2002).
- 2. Trunzer, K. *et al.* Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **31**, 1767–74 (2013).
- 3. Gray, M. R. *et al.* Metastatic melanoma: lactate dehydrogenase levels and CT imaging findings of tumor devascularization allow accurate prediction of survival in patients treated with bevacizumab. *Radiology* **270**, 425–34 (2014).
- 4. Díaz-Lagares, A. *et al.* Evaluation of multiple serum markers in advanced melanoma. *Tumour Biol.* **32**, 1155–61 (2011).
- 5. Sanmamed, M. F. *et al.* Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin. Chem.* **61**, 297–304 (2015).
- 6. Schreuer, M. *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. *J. Transl. Med.* **14**, 95 (2016).
- 7. Funck-Brentano, E. *et al.* Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance. *Ann. Oncol.* **26**, 1470–1475 (2015).
- 8. Kramkimel, N. *et al.* Vemurafenib pharmacokinetics and its correlation with efficacy and safety in outpatients with advanced BRAF-mutated melanoma. *Target. Oncol.* **11**, 59–69 (2016).
- 9. Goldwirt, L. *et al.* Reply to 'Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance' by Funck-Brentano et al. *Ann. Oncol.* **27**, 363–4 (2016).
- 10. Funck-Brentano, E. *et al.* Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance. *Ann. Oncol.* **26**, 1470–5 (2015).
- 11. Puszkiel, A. *et al.* Plasma vemurafenib exposure and pre-treatment hepatocyte growth factor level are two factors contributing to the early peripheral lymphocytes depletion in BRAF-mutated melanoma patients. *Pharmacol. Res.* (2016). doi:10.1016/j.phrs.2016.06.032
- Zhen, Y. *et al.* An HPLC-UV method for the simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib in plasma from cancer patients. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 928, 93–7 (2013).
- 13. Taly, V. *et al.* Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect KRAS Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. *Clin. Chem.* (2013). doi:10.1373/clinchem.2013.206359
- 14. Milbury, C. A. *et al.* Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. *Biomol. Detect. Quantif.* **1**, 8–22 (2014).
- 15. Zonta, E., Garlan, F., Perez-Toralla, K. & Taly, V. Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations.
- 16. Gray, E. S. *et al.* Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget* **6**, 42008–18 (2015).

B.II.3. DISCUSSION DE LA PARTIE B

Comparaison de la détection de l'ADNtc par la quantification de mutations ou de l'hyperméthylation.

Dans l'étude A.III., nous avons pu démontrer la possibilité de suivre l'évolution tumorale par la quantification de l'hyperméthylation de l'ADNtc chez des patients atteints de cancer colorectal de tous stades. Sur cette base, la cohorte PLACOL a pu être exploitée de façon optimale, avec le suivi de plus de 69% des patients dont la tumeur ne présentait pas de mutation pour laquelle un test était développé. Cette étude est pionnière dans l'évaluation de l'impact clinique de l'ADNtc présentant une altération épigénétique.

Nous avons interrogé l'existence d'un biais selon que l'ADN était détecté par la présence d'une mutation, ou par l'hyperméthylation. Pour ce faire, nous avons évalué les pourcentages de positivité de l'ADN muté et l'ADN hyperméthylé circulants ont été comparés avant traitement. Au premier prélèvement (avant traitement, C₀), il n'y avait pas de différence significative entre la proportion de patients positifs pour la présence d'ADNtc détecté par mutation (36/43, 83,7%), et la proportion de patients dont l'ADNtc a été détecté par l'hyperméthylation de *WIF1* ou de *NPY* (37/39, 69,2%). Ces résultats confirment que la détection de l'ADN par la détection de la mutation ou de l'hyperméthylation n'induit pas de biais.

De plus, Garrigou *et al.*³⁵⁴ ont observé une forte corrélation entre les pourcentages d'ADN circulant muté et hyperméthylé au cours du suivi des patients. Le traitement bisulfite peut induire une perte d'ADN total (tumoral et non tumoral) qui n'impacterait potentiellement pas le pourcentage d'ADNtc mesuré. Cependant, la perte d'ADN tumoral pourrait influencer la concentration évaluée, dès lors que nous mesurons directement la quantité d'ADN hyperméthylé. Il faudrait alors vérifier que la conversion bisulfite n'impacte pas la comparaison des concentrations d'ADN circulant muté et hyperméthylé. Il serait donc pertinent de confirmer la corrélation entre les quantités d'ADN muté circulant et celles d'ADN hyperméthylé. De plus, les tests utilisés pour la détection de méthylation présentent des limites de blancs (LOB) supérieures aux tests utilisés pour la détection de mutations ainsi que des sensibilités inférieures ce qui peut expliquer cette légère différence dans la quantité de patients présentant de l'ADNtc détecté par la présence d'hyperméthylation des gènes *WIF1* et *NPY* en comparaison à la détection de mutation(s).

Potentiel clinique de l'ADNtc pour la prédiction de l'efficacité thérapeutique.

La valeur pronostique de l'ADNtc a été confirmée dans notre étude, avec un impact sur la survie globale de la concentration en ADNtc. Plus celle-ci est élevée, moins le pronostic est bon. Ce résultat confirme ce qui a été démontré auparavant dans plusieurs études.

En revanche, la prédiction de la réponse au traitement, quel qu'il soit, a peu été explorée. Dans notre étude, nous avons pu démontrer que les variations précoces de la concentration en ADNtc étaient prédictives de la réponse au traitement, en termes de survie. En outre, la comparaison des variations de l'ADNtc et de celles des lésions cibles selon les critères RECIST a démontré qu'il existe une corrélation entre la mesure de l'ADNtc et la réponse tumorale.

Ces résultats suggèrent que l'ADNtc, par l'utilisation des critères composites mis en évidence (pente, passage en dessous d'un seuil de « normalisation »), pourrait permettre d'affiner le pronostic et d'estimer la réponse au traitement de manière plus précise que les marqueurs cliniques actuels comme les critères RECIST.

Tout au moins, ces résultats suggèrent que l'ADNtc pourrait être un outil moléculaire clinique complémentaire aux outils utilisés. Les critères d'évaluation qui ont été mis en évidence dans l'étude PLACOL démontrent qu'il existe plusieurs façons d'analyser les variations d'ADNtc et d'en évaluer l'impact clinique.

Aspects analytiques de l'ADNtc : vers la précision du potentiel clinique de l'ADNtc au cours du traitement

Apport de la précision de l'analyse cinétique de l'ADNtc sur la détermination de la survie sans progression

Le projet PLACOL a mis en évidence l'impact clinique de la quantification de l'ADNtc pour l'évaluation du pronostic. En effet, dès les premiers prélèvements consécutifs à l'initiation du traitement, la dynamique de l'ADNtc apporte une information précoce sur la réponse thérapeutique. La quantification de l'ADNtc semble être le reflet en temps réel de la masse tumorale mais aussi de l'agressivité du cancer. Dans le cas de cancers métastatiques, il n'est pas toujours évident de quantifier les lésions tumorales par les techniques d'imagerie.

De plus, les paramètres mis en évidence dans notre étude (pente, seuil atteint de 0.1 ng/mL) suggèrent qu'un patient dont la somme des lésions est importante au diagnostic est susceptible de répondre au traitement et de présenter un bon pronostic, quel que soit son traitement. Les variations de la concentration en ADNtc représentent ainsi un marqueur pertinent pour orienter au plus rapidement le traitement des patients vers une autre alternative thérapeutique. Le fait que divers profils, croissant et décroissant, apparaissent, n'est pas surprenant au vu des précédents travaux étudiant le suivi de l'ADNtc chez des patients atteints de cancer colorectal^{90,134,201}. En revanche, l'affinement de l'analyse des variations de l'ADNtc avec la notion de normalisation, de pente pronostique, ont permis de préciser les paramètres à surveiller pour une application clinique potentielle. En effet, la « normalisation » ou passage en dessous d'un certain seuil apparaît comme le plus fort facteur de bon pronostic. Si ce seuil de normalisation n'est pas atteint, la pente de décroissance apparaît comme un second paramètre pertinent pour l'évaluation du pronostique. La combinaison de ces paramètres analytiques n'a à ce jour jamais été appliquée dans des études antérieures portant sur l'ADNtc.

Modèles basé sur l'analyse ponctuelle de l'ADNtc

Majoritairement, les précédents travaux se sont consacrés à l'étude de l'impact pronostique de la valeur en ADNtc (concentration ou pourcentage) avant initiation du traitement. Il est désormais reconnu que la quantité d'ADNtc est statistiquement corrélée à la survie. Cependant, il s'agit d'un

paramètre ponctuel, dont l'analyse subit nécessairement l'impact des potentielles variabilités inter- et intra-individuelles³⁵⁵. En outre, et de façon particulièrement importante, l'objectif d'un biomarqueur du cancer est sa capacité à évaluer la réponse au traitement, quel qu'il soit, et le pronostique tout au long du suivi des patients. Or l'évaluation d'une donnée ponctuelle en amont du traitement informe sur la survie globale, et non sur l'efficacité du traitement, non entamé. Il faut donc s'intéresser à la détermination d'autres paramètres analytiques prenant en compte les variations de l'ADNtc.

La « normalisation » est, au sens strict, le passage dans une gamme normale de valeurs. Or il est difficile d'évaluer une telle zone de valeurs dans le cas de patients atteints de cancer de stade 4, présentant plusieurs sites métastatiques. Cependant, il est apparu assez clair dans notre étude qu'une partie des patients « normalisaient » leur concentration plasmatique en ADNtc dès les 2 premiers prélèvements, et que ce passage en dessous d'un seuil, le plus faible possible, estimait un meilleur pronostique que dans les cas de non normalisation. Cela apporte ainsi la preuve que dans des cas de maladie avancée, il est possible de considérer une normalisation de l'ADNtc, et que c'est un paramètres très pertinent dans l'évaluation de la réponse au traitement. A noter que les patients chez lesquels une normalisation de la concentration en ADNtc était observée, la somme des lésions diminuait de façon importante, en dépit de la persistance de lésions. Nous pouvons difficilement parler de normalisation stricte dès lors que la concentration restait non nulle (supérieure à 0.1 ng/mL). Cependant, la valeur pronostique d'une telle diminution, qui plus est très précoce (au cycle 1 ou 2 de traitement, 2 ou 4 semaines respectivement), est très forte, en particulier chez des patients en cancer de stade IV.

Une autre analyse consisterait en la détermination d'une valeur seuil, cette limite permettant de discriminer les pronostics de patients. La valeur 0.1 ng/mL a été observée comme pronostique et prédictive de la réponse au traitement dans notre étude. Il serait pertinent de préciser ce paramètre par la reproduction d'études similaires, dans des conditions strictement identiques afin de prévenir de potentielles variabilités inter-études. Les aspects de normalisation ou de passage en dessous d'une valeur seuil prennent en compte un unique point au cours du suivi. Une limitation est la détermination de ce point choisi, différent selon les patients. Dans notre étude, nous avons vérifié que le cycle de chimiothérapie pris en compte (« C_{2or1} ») n'induisait pas de biais en ajustant nos analyses de survie (OS et PFS) sur le prélèvement considéré (**Tables 2 et 3** de l'article).

Analyse continue: étude de la dynamique des variations de l'ADNtc

Afin de prendre en compte la dynamique des variations en ADNtc, des analyses continues semblent plus appropriées. Dans ce but, l'analyse d'au moins 2 points distants d'un certain lapse de temps est requise, tout en ne nécessitant que peu d'échantillons. Là encore, les études de la littérature ont principalement axé leur analyse sur un différentiel de pourcentage entre le temps avant traitement (ligne de base) et un second point, 15 jours ou 1 mois voire plus afin de corréler aux évaluations par imagerie, tous les 2 mois, rendant la comparaison entre les valeurs obtenues parfois non pertinente. En effet, nous avons vu que les variations dans le premier mois de traitement étaient parfois importantes. La cinétique de l'ADNtc a intérêt à être évaluée lors des premiers prélèvements, et ensuite aux évaluations, mais selon d'autres considérations, reposant sur une approche de mesure du temps avant que l'évènement se produise.

Dans son étude, Diehl a initié la détermination du différentiel de pourcentage, pour l'analyse des variations de l'ADNtc, qui a ensuite été reprise dans de nombreuses études. La détermination de la pente, utilisée dans notre étude, a peu été étudiée.

Dans le cas de l'analyse des profils de patients du groupe dit « décroissants », 80% de diminution de la concentration en ADNtc a été déterminée comme meilleure valeur seuil par un test log-rank (Mandrekar *et al.*³⁵⁶). La pente de décroissance a peu été utilisée. Une étude a porté sur la différence du nombre de cellules tumorales circulantes entre deux temps, et a déterminé que cette approche était plus pertinente que la détermination d'une valeur absolue³⁵⁷. Cela a pu être déterminé dans d'autres études sur l'ADNtc, notamment celle de Tie *et al*, où une diminution de 10 fois par rapport à la valeur initiale a été associée à une meilleure survie sans progression chez des patients atteints de cancer colorectal métastatique³⁵⁸.

De la même façon que de fortes disparités ont été mises en évidence entre études visant à déterminer des valeurs pronostiques de dosages des antigènes (CA125 dans le cancer de l'ovaire ^{359,360}, CA15.3 dans le cancer du sein³⁶¹), il faudrait un consensus, à terme, sur l'évaluation de l'impact clinique des variations en ADNtc afin de tirer profit du potentiel de ce marqueur pour le suivi des patients en application clinique.

Afin d'étudier la valeur prédictive de l'ADNtc sur la réponse tumorale, il faudrait pouvoir détecter la progression en amont de l'évaluation RECIST. Pour cela, des analyses longitudinales sont requises, étant donné les grandes variabilités inter- et intra- individus quant à la réponse tumorale. Un temps de détection d'une remontrée de l'ADNtc avant la progression devrait être évalué. Cependant, une telle analyse prendrait en compte plusieurs paramètres, difficiles à déterminer. Notamment, quelle augmentation d'ADNtc peut être considérée comme significative ? La problématique des dates d'évaluation, tous les 2 mois (en théorie) ne permet pas statuer quant à l'absence de détection par imagerie d'une apparition de lésion ou d'une augmentation de la taille des lésions.

Suivi de l'ADNtc: vers un suivi personnalisé des patients atteints de cancer métastatique

Nous avons vu, au cours de l'étude PLACOL, qu'une prise en charge améliorée des patients pourrait être réalisable par un suivi précoce de l'ADNtc. Dès lors que les premiers prélèvements ne démontrent pas une diminution significative de la concentration d'ADNtc, par une normalisation ou une pente de décroissance très forte, l'orientation vers un traitement différent, en alternative au premier, pourrait alors être envisagée pour les patients métastatiques.

En application du suivi de l'ADNtc chez des patients en cours du traitement, une étude a été présentée en dernier chapitre de la seconde partie, portant sur une petite cohorte de patients atteints de mélanome métastatique. Cette étude s'est avérée particulièrement intéressante dans le cadre du dosage de l'ADNtc et du traitement ciblé vémurafenib. En effet, l'étude de la biodisponibilité plasmatique en vémurafenib, associée à la quantification de l'ADNtc, a permis de mettre en valeur l'intérêt de ces dosages. La disponibilité plasmatique en vémurafenib chez les patients est très hétérogène, et s'est avérée inversement corrélée à la concentration en ADNtc. Cette étude fait donc émerger des outils complémentaires pour le suivi et l'optimisation de l'orientation thérapeutique des patients atteints de mélanome métastatique.

Par ces divers aspects, des éléments apparaissent comme pertinents pour préciser l'analyse de l'ADNtc, évaluer son potentiel comme biomarqueur de l'efficacité du traitement et ainsi optimiser l'orientation thérapeutique des patients.

L'ADNtc a été décrit comme une représentation à un instant donné des altérations de la ou les tumeurs présentes chez un patient. Il n'est cependant pas complètement évident, dans le cas de cancers métastatiques, que l'ADNtc soit représentatif de la maladie dans sa globalité. En effet, plusieurs sites métastatiques risquent de ne pas libérer l'ADNtc de façon identique selon le type de tissu. Les différents organes touchés par une invasion métastatique pourraient présenter un métabolisme variable en réaction au traitement. Il faudrait ainsi préciser la libération d'ADNtc dans le cas de métastatses, et déterminer la représentativité des lésions dans leur globalité.

CONCLUSION GENERALE

La détection de l'ADNtc requière une technique hautement précise, robuste et sensible. Les tests que nous avons développés en PCR digitale en gouttelettes ont été caractérisés de façon à évaluer leur spécificité et leur sensibilité.

Par cette approche, nous avons pu développer un test de caractérisation de la fragmentation de l'ADNtc. Les résultats suggèrent la circulation de l'ADNtc sous forme de petits fragments. Afin d'améliorer le taux de détection lorsqu'il est très rare, et de le quantifier précisément, il est préférable d'utiliser des tests générant de petits amplicons.

Une autre approche, avec la technologie BIABooster, a permi de confirmer les résultats de PCR digitale en gouttelettes. Cette technique présente l'avantage d'être une méthode de détection directe de l'ADN (sans amplification). Les résultats obtenus sont cohérents avec les articles récemment parus et portant sur la fragmentation de l'ADNtc^{133,319}.

Cette étude de la fragmentation a permis de comparer l'intégrité de l'ADNtc chez les patients en comparaison aux sujets sains. Une différence existe entre ces populations, suggérant que l'intégrité de l'ADNtc pourrait être un marqueur du cancer. Ainsi, en plus d'apporter des précisions sur les paramètres à prendre en compte pour le développement de tests de détection l'ADNtc, la fragmentation est un marqueur potentiel qui, s'il s'avère pertinent, pourrait s'affranchir de la détermination du statut mutationnel. Il s'agit aussi d'un des avantages de l'évaluation de la méthylation.

Nos résultats démontrent que seulement 2 tests de l'hyperméthylation (*NPY, WIF1*) permettent de détecter spécifiquement l'ADN extrait de tumeur chez plus de 90% des patients. En outre, une forte corrélation a été observée entre les pourcentages d'ADN muté et d'ADN hyperméthylé. Ces deux résultats suggèrent que le suivi de l'ADN circulant hyperméthylé pourrait permettre le suivi d'une grande proportion de patients atteints de CCR.

Ces diverses approches précisent les méthodes de détection quantitative de l'ADNtc, et simplifient considérablement sa quantification. Les techniques développées dans ce projet facilitent tout en précisant la détection de l'ADNtc, ce qui contribue au transfert vers une application de ce biomarqueur en routine clinique.

La valeur pronostique de l'ADNtc a été évaluée dans l'étude clinique PLACOL, et dans les études portant sur le mélanome ou le cancer du pancréas (présentée en Annexe). Dans ces études, la quantification de l'ADNtc au cours du suivi des patients s'est avérée informative.

L'étude PLACOL est pionnière dans la détection de l'ADN tumoral muté ou hyperméthylé. L'évaluation de l'hyperméthylation chez des patients ne présentant pas de mutation *KRAS* ou *BRAF* a rendu possible le suivi des variations de l'ADNtc. Ainsi, plus de 69% de patients ont pu être suivis par le ciblage de l'hyperméthylation, en alternative au séquençage, onéreux et de sensibilité plus faible que la PCR digitale en gouttlettes.

Les résultats ont démontré que la quantification de l'ADNtc dès le début du traitement pouvait prédire le pronostic des patients. De façon intéressante, le passage en dessous d'un seuil de « normalisation » dès les deux premiers prélèvements sanguins suggère une bonne réponse au traitement. Cela permet d'envisager une alternative thérapeutique précoce pour les patients dont l'ADNtc reste supérieur au seuil de 0,1 ng/mL. A noter que les patients suivaient des traitements différents, ce qui renforce l'intérêt de la détection de l'ADNtc. La pente de décroissance s'est aussi avéré être un paramètre pronostique. Ces paramètres d'analyses suggèrent la possibilité d'adapter précocement le traitement des patients selon leur profil d'ADNtc au cours des premiers prélèvements.

L'étude sur le mélanome a suggéré que la quantification du vémurafenib dans le sang des patients pourrait présenter une utilité clinique. Une telle étude est pionnière en ce qu'elle compare l'ADNtc à la concentration plasmatique en vémurafenib. Le mélanome est une maladie dont l'incidence augmente et le pronostic est très mauvais dès lors que des métastases se sont développées. Elles sont souvent difficilement mesurables par imagerie, ce qui complique l'évaluation du pronostic. L'ADNtc a été suggéré comme un marqueur pronostique dans plusieurs études sur le mélanome métastatique. Dans le cadre des thérapies ciblées, et de la résistance observée dans le cas des patients traités par vémurafenib, le dosage de cet agent thérapeutique s'est démontré très informatif sur la réponse au traitement. Lorsque la concentration plasmatique chute, une progression est souvent observée dans un court délai. Ainsi, devant le manque de marqueurs biologiques, cette étude suggère l'intérêt du suivi de la biodisponibilité du traitement des patients.

PERSPECTIVES

Ce projet de thèse a permis d'explorer plusieurs aspects de la mesure de l'ADNtc, et ouvre de nombreuses perspectives au vu des travaux réalisés.

Nous avons pu développer et optimiser des tests robustes, sensibles et spécifiques de détection et de quantification de l'ADNtc par PCR digitale en gouttelettes. Nous pouvons ainsi nous baser sur cette technologie pour aller plus loin dans l'étude des aspects cliniques de l'ADNtc.

Nos résultats, en concordance avec ceux de la littératue, suggère que l'intégrité de l'ADNtc présente un réel potentiel clinique. Il serait nécessaire de réaliser une étude incluant un plus grand nombre de patients et de sujets sains, dans des conditions strictement homogènes de collecte des échantillons : prélèvement avant l'initiation du traitement afin que le traitement n'induise pas de biais, conditions identique de stockage et de collecte pour tous les échantillons. De plus, stratifier les patients selon la quantité d'allèles circulants mutés pourrait préciser l'origine de l'ADNtc, sa structure sous forme de petits fragments et donc sa capacité à devenir un marqueur pertinent du cancer. Il pourrait être utile, dans un second temps, d'évaluer l'impact du (des) traitement(s) sur l'intégrité de l'ADNtc, afin de déterminer l'impact potentiel de la chimiothérapie sur la fragmentation. Ce marqueur pourrait présenter un intérêt pour le suivi des patients au cours du traitement.

L'évaluation de l'hyperméthylation de l'ADNtc présente un très fort potentiel en ce qu'elle permet de cibler une large population de patients atteints de CCRm avec un nombre limité de tests. L'étude PLACOL nous permet de soulever certains questionnements qu'il serait nécessaire d'évaluer dans de futurs travaux, afin de confirmer les paramètres pronostiques identifiés. Notamment, il faudrait confirmer la corrélation entre les concentrations de séquences mutées et hyperméthylées. Une étude dans laquelle les quantités d'ADN circulant muté et hyperméthylé seraient mesurées chez tous les patients pourrait être réalisée.

Dans notre étude, les mutations majoritairement ciblées sont impliquées dans la résistance aux traitements ciblés anti-EGFR. Pour s'affranchir de tout biais potentiel du suivi de ces mutations, il s'agirait de valider l'évaluation de l'hyperméthylation en alternative à la mesure de l'ADN muté circulant, quelle que soit la mutation. Pour ce faire, il pourrait être pertinent de cibler un panel diversifié de mutations en parallèle de la mesure de l'hyperméthylation.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence des paramètres significatifs pour l'évaluation du pronostique et de l'efficacité thérapeutique. Les patients de la cohorte PLACOL suivaient des traitements divers. Il serait pertinent de définir une étude dans laquelle un bras suivrait un traitement ciblé par exemple, et un autre incluerait tous les traitements sans restriction. Nous pourrions ainsi évaluer l'utilité des paramètres pronostiques et prédictifs de l'efficacité thérapeutique, tous traitements confondus. Nos travaux ont porté majoritairement sur le cancer colorectal. Il serait intéressant de tester le paramètre composite (pente et seuil de normalisation) dans d'autres types de cancers. Dans le cas où les validations requises, évoquées plus haut, mènent à des résultats convaincants, une perspective attractive serait la mise en place d'études interventionnelles.

ANNEXES A. INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES DU CHAPITRE A.I.

Amplicon (bp)	r ione tybe		MUT probe	WT probe	Reverse Primer	Forward Primer	KRAS Exon	Location	Nucleotide Variant	Assays
N/A	(LifeTech)	CAST		custom	custom	custom	Intron 3	chr.12 25378771	WT	KRAS Ref
N/A	(LifeTech)	CAST	custom	ı.	custom	custom	Exon 3	chr.12 25380277- 25380278	c.181TC>AA	p.Q61K
N/A	(LifeTech)	CAST	custom	I.	custom	custom	Exon 3	chr.12 25380277	c.181C>A	p.Q61K
N/A	(LifeTech)	CAST	custom	ſ.	custom	custom	Exon 3	chr.12 25380275	c.183A>C	p.Q61H
NïA	(LifeTech)	CAST	custom	r.	custom	custom	Overlaps In4 - Ex4	chr.12 25378562	c.436G>A	p.A146T
NiA	(LifeTech)	CAST	•	custom	custom	custom	Exon 3	chr.7 140534468	WT	BRAF Ref
N/A	(LifeTech)	CAST	custom	I.	custom	custom	Exon 11	chr.7 140481402- 140481403	c.1406G≻C	G469A
N/A	(LifeTech)	CAST	•	custom	custom	custom	Exon 4	chr.1 115252310	WT	NRAS Ref
N/A	(LifeTech)	CAST	custom	I	custom	custom	Overlaps In2 - Ex3	chr.1 115256529- 115256530	c. 182A>G	O61R
N/A	(LifeTech)	CAST	ï	custom	custom	custom	Exon 1	chr.17 7590792	WT	TP53 Ref
N/A	(LifeTech)	CAST	custom	I.	custom	custom	Overlaps In4-Ex4	chr.17 7578406	c.524G>A	p. R175H
N/A	(LifeTech)	CAST	custom	1	custom	custom	Overlaps In 6 - Ex6	chr.17 7577537- 7577538	c.743_744G G>AA	p.R248Q
N/A	(LifeTech)	CAST	custom	1:	custom	custom	Exon 7	chr.17 7577120	c.818G>A	p.R273H
N/A	(LifeTech)	CAST	custom	L	custom	custom	Exon 7	chr.17 7577121	c.817C>T	p.R273C

I. Caractéristiques des sondes CAST[™] testées en PCR digitales en gouttelettes.

Tableau 8. Caractéristiques des sondes CAST[™] testées en PCR digitales en gouttelettes. Ces sondes ont été testées en sensibilité et spécificité (dilutions et test sur ADN de contrôle négatif (ADNg)).

II. Résultats de PCR digitale en gouttelettes pour l'évaluation de 4 sondes CAST[™] ciblant des mutations du gène *KRAS*.



Figure 57. Graphiques de résultats de PCR digitale en gouttelettes combinée aux sondes ciblant des mutations de KRAS. Les clusters MT (axe X, CompPMT1) et WT (axe Y, CompPMT2) sont entourés de façon à comptabiliser les gouttes encapsulant les molécules cibles KRAS mutées et KRAS sauvages, respectivement.





Figure 58. *Graphiques de résultats de PCR digitale en gouttelettes combinée aux sondes ciblant des mutations de TP53 ou BRAF.* Les clusters *MT* (axe *X*, *CompPMT1*) et *WT* (axe *Y*, *CompPMT2*) sont entourés de façon à comptabiliser les gouttes encapsulant les molécules cibles TP53 mutées et TP53 sauvages, *respectivement ou BRAF mutées et BRAF sauvages (4ème ligne).*

IV. Comparaison des sondes CAST[™] et TaqMan®



Comparaison sondes TP53 p.R248Q taqman et CAST

Figure 59. Graphiques de PCR digitale en gouttelettes pour la comparaison des sondes TaqMan® (A) et CAST (B) ciblant la mutation TP53 R248Q (population sur l'axe x) et la référence TP53 (wild-type (WT), population sur l'axe Y, fluorescence VIC). Panel B : une population intermédiaire est observée entre les populations vides (« quenched ») et mutées (MT). Cette population augmente notablement avec la quantité d'ADN analysée, bien que non présente dans la population cible mutée (définie à partir du contrôle positif). Les populations (cercles ou « clusters ») ont été définies à partir du contrôle positif correspondant.

ANNEXES B. SUIVI DES VARIATIONS DE L'ADNTC CHEZ 2 PATIENTS DE LA COHORTE PLACOL


Figure 60. Représentation des variations d'ADNtc (ligne bleue, %) et de l'évaluation clinique (somme des lésions, barres) au cours du suivi du patient A. A noter que ce patient ne présente pas d'ACE. On observe une forte diminution (de 25% à une disparition de l'ADNtc), au cours des 14 premiers jours de traitement. Puis le pourcentage d'ADNtc augmente (fortement à 85-90 jours), ce qui apparaît corrélé à l'augmentation de la taille des lésions (barres noires). La maladie passe de stabilité à progression suite à l'augmentation de ces marqueurs.



Figure 61. Représentation des variations d'ADNtc (ligne bleue, %) et de l'évaluation clinique (somme des lésions, barres ; ACE, ligne rouge) au cours du suivi du patient B. On observe une forte diminution au cours des premiers mois de suivi du patient, avec une période de stabilité à zéro (de 90 à 182 jours envrion). Ensuite, l'ADNtc semble augmenter jusqu'à quelques pourcents, et diminue jusqu'à zéro encore. Finalement, une très forte augmentation est observée, avec un pourcentage atteignant plus de 15%, cohérent avec l'apparition de nouvelles lésions.

ANNEXES C. ARTICLE : "PLASMATIC CIRCULATING TUMOR DNA IN PANCREATIC CANCER PATIENTS IS A PROGNOSTIC MARKER"

Plasmatic Circulating Tumor DNA in pancreatic cancer patients is a prognostic marker

Daniel Pietrasz^{1, 2}, MD, Nicolas Pécuchet², MD, Fanny Garlan², Audrey Didelot², Olivier Dubreuil³, MD, Solène Doat³, MD, Francoise Imbert-Bismut⁴, Mehdi Karoui¹, MD, PhD, Jean-Christophe Vaillant¹ MD, PhD, Valérie Taly², PhD, Pierre Laurent-Puig², MD, PhD, Jean-Baptiste Bachet^{2,3}, MD, PhD.

¹Department of Digestive and Hepatobiliary Surgery, Pitié-Salpêtrière Hospital, Sorbonne University, UPMC University, Paris 06, France.

²Université Paris Sorbonne Cité, INSERM UMR-S1147 MEPPOT, CNRS SNC5014, Centre Universitaire des Saints-Pères, Paris, France. Equipe labélisée Ligue contre le Cancer ³Gastroenterology and Digestive Oncology Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Sorbonne University, UPMC University, Paris 06, France.

⁴Department of Metabolic Biochemistry, Pitié-Salpêtrière Hospital, Sorbonne University, UPMC University, Paris 06, France.

Running Title: (57 characters)

CtDNA is a prognostic marker in pancreatic adenocarcinoma

Key words: Pancreatic Adenocarcinoma, Circulating tumor DNA, Prognostic, KRAS, NGS,

digital PCR

<u>Financial Support</u>: M. Daniel Pietrasz was supported by a grant from the Fondation d'Aide et Recherche en Cancérologie Digestive (A.R.CA.D).

Disclosure:

VT: Honoraria from Raindance Technologies and Boerhinger Ingehleim

Word count: 3062 words Tables: 2 Figures: 3 Supplementary data files: 4

Correspondence and reprints requests to:

Jean-Baptiste Bachet, M.D., PhD., Department of Gastroenterology and Digestive Oncology, Pitié-Salpêtrière Hospital, Sorbonne University, UPMC University Paris 06, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Tel: +33 1 42 16 10 41; Fax: +33 1 42 16 12 38; E-Mail: jean-baptiste.bachet@aphp.fr

Translational relevance (149 words)

Possibilities of translational research in pancreatic adenocarcinoma (PAC) have been limited during last years by the difficulty to obtain sufficient tumor tissue, in quantity and quality. The identification of biological marker from blood could help to overcome this issue. The circulating tumor DNA (ctDNA) is one of the most promising blood biomarkers, allowing to give information about molecular abnormalities, and is associated with a prognostic and/or predictive value in others malignancies. Our study is the first to show that targeted NGS is usable to detect ctDNA in a routine, allowing a large genes screening, and with concordant results obtained with picoliter droplet based digital PCR. Our work highlights that the presence of ctDNA appear as an independent prognostic factor at all stages of PAC, in advanced diseases as after curative-intent resection. The described procedure may have great potential as new, simple and non-invasive strategy for patient's care and follow-up.

Abstract: (250 words)

Purpose

Despite recent therapeutic advances, prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma (PAC) remains poor. Analyses from tumor tissues presenting limitations, identification of informative marker from blood might be a promising alternative.

The aim of this study was to assess the feasibility and the prognostic value of circulating tumor DNA (ctDNA) in PAC.

Experimental Design

From 2011 to 2015, blood samples were prospectively collected from all consecutive patients with PAC treated in our center. Identification of ctDNA was done with Next Generation Sequencing targeted on referenced mutations in PAC and with picoliter droplet digital PCR.

Results

A total of 135 patients with resectable (n=31; 23%), locally advanced (n=36; 27%) or metastatic (n=68; 50%) PAC was included. In patients with advanced PAC (n=104), 48% (n=50) had ctDNA detectable with a median mutation allelic frequency (MAF) of 6.1%. Presence of ctDNA was strongly correlated with poor overall survival (OS) (6.5 vs. 19.0 months; P<0.001) in univariate and multivariate analysis (HR=1.96; P=0.007). To evaluate the impact of ctDNA level, patients were grouped according to MAF tertiles: OS were 18.9, 7.8 and 4.9 months (P<0.001). Among patients who had curative intent resection (n=31), 6 had ctDNA detectable after surgery, with a MAF of 4.4%. Presence of ctDNA was associated with a shorter disease free survival (4.6 vs.17.6 months; P=0.03) and shorter OS (19.3 vs 32.2 months; P=0.027).

Conclusions

CtDNA is an independent prognostic marker in advanced PAC. Furthermore, it arises as an indicator of shorter disease free survival in resected patients when detected after surgery.

INTRODUCTION

Pancreatic Adenocarcinoma (PAC) is a leading cause of cancer-related mortality in western countries and should become the second leading cause of cancer death in 2020.(1,2) Surgery remains the cornerstone of treatment for patients with resectable PAC and the only curative treatment. Because of aggressive growth, early dissemination and lack of early symptoms, 80% of patients are diagnosed at late clinical stages.(3) Despite recent improvements with new chemotherapy protocols such as FOLFIRINOX or gemcitabine plus *nab*-paclitaxel,(4,5) patients prognosis remains very poor. Many serological markers have been tested like Carbohydrate Antigen 19-9 (CA 19-9) but none is highly prognostic in PAC.(6) These tumors are characterized by tumor-specific genetic and epigenetic changes in DNA, including frequent mutations in *CDKN2A, SMAD4, TP53* or *KRAS* genes (7-9), which can be used as potential markers. However, their widespread use is limited by the difficulty to obtained tissues from patients using endoscopic technics and because only 20% of patients present a resectable tumor. In this context a prognostic non-invasive blood test for PAC would be very valuable.

Measuring tumor-specific alterations in blood nucleic acids offers an interesting approach. In this context, circulating tumor DNA (ctDNA) has produced interesting results for a wide range of cancers.(10,11). The fraction of patients with detectable plasmatic ctDNA as well as its concentration increased with tumor stage.(12) Recent studies demonstrated the prognostic impact of ctDNA in metastatic colorectal cancer.(13,14) In fact, early changes in ctDNA during first line chemotherapy have been shown to predict the later radiologic response.(15)

Recent studies demonstrated a strong correlation between genomic alterations found in pancreatic tumors by sequencing and those found after characterization of DNA extracted from plasma of the same patients.(16). CtDNA has also been evaluated as diagnostic marker to improve CA 19-9 value.(17) By combining *KRAS* mutations in ctDNA with CA 19–9 levels, Dabritz *et al.* were able to diagnose PAC with a sensitivity of 91%.(18) Despite these results, few information exist on the prognostic value of ctDNA.(16,19,20)

258

The aim of the present study was to evaluate the feasibility of the detection of ctDNA and the prognostic value of ctDNA in patients with PAC.

PATIENTS & METHODS

Sample extraction and clinicopathological data

From January 2011 to May 2015, plasmas of all consecutive patients with histologically proven PAC, receiving first chemotherapy protocol, were prospectively collected in the Pitié Salpêtière hospital (Paris, France) including resectable, locally advanced and metastatic stages. Blood samples were collected just before: (i) the first cycle of adjuvant treatment, after surgical resection in patients who had curative resection, or (ii) the first cycle of chemotherapy in patients with locally advanced or metastatic disease. All the patients signed an informed consent form, approved by the ethic committee (CPP IIe-de-France 2014/59NICB). The following data were collected in a prospective database: clinical and pathological characteristics (gender, age, medical history, date of diagnosis, location of the primary tumor, primary tumor diameter, tumor differentiation grade, stage of the disease), follow-up data (date of primary resection, date and type of relapse, date of diagnosis of metastatic disease, date and type of chemotherapy regimen, date and type of chemoradiotherapy, date of death or last follow-up) and biologic data (CEA, CA 19-9, albuminemia, bilirubinemia).

DNA extraction from the plasma

Blood samples (9mL) were withdrawn from a central catheter and placed in EDTA tubes. The collected samples were centrifuged at 3,500 rpm for 15 min at 4°C in a delay inferior to 3 hours. Plasma was stored at -80°C until further use. DNA was extracted from plasma with QIAamp® Circulating Nucleic Acid kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Incubation with proteinase K was performed for 30 min at 68°C. Extracted DNA from 2mL of plasma was eluted with 50µL buffer AVE and stored at -80°C. DNA quantity were assessed using the Qubit[™] dsDNA HS (High Sensitivity) Assay kit (Thermo Fisher).

Next Generation Sequencing (NGS)

Sequencing libraries were prepared from circulating-free DNA using Ion AmpliSeq[™] Colon and Lung Cancer Research Panel v2 (Thermo Fisher).(21) According to manufacturer's protocols, 10ng of DNA for each sample was used as input for library preparation with the Ion AmpliSeq[™] Library Kit 2.0 (Thermo Fisher). The pooled barcoded libraries (max 96) were processed on Ion Chef[™] System using the Ion PI Hi-Q Chef Kit (A27198) and sequenced on the Ion Proton[™] System using and Ion PI Chip Kit v3 (A26771). The NGS analysis method (see **Supplementary Data File 1**) has been specifically developed to detect Iow allele frequency mutations. This method sensitivity and specificity have been validated in positive and negative controls (manuscript submitted).

Droplet-based digital PCR

All plasma samples were screened for the 3 most frequent *KRAS* mutations in PAC (ie. p.G12V, p.G12D, p.G12R) by picoliter droplet-based digital PCR using RainDrop® system (RainDance Technologies). In addition, all additional *KRAS* mutations detected by NGS sequencing were also analyzed. This system is based on the use of aqueous picolitersize droplets separated by oil in microfluidic systems acting as independent PCR reactors.(22) Using this system, single target DNA molecules were compartmentalized in picoliter droplets together with validated fluorogenic TaqMan[™] probes specific for mutated and wild-type *KRAS* and all reagents needed for PCR amplification.(23,24) After thermocycling, the fluorescence of each droplet was measured. The amplification of mutant DNA gives a green-fluorescent droplet while the amplification of wild-type DNA gives a redfluorescent droplet. The ratio of mutant to wild-type DNA was determined from the ratio of green to red droplets. This strategy is both highly quantitative and highly sensitive.

Analyses were performed as described previously.(24) Briefly, after testing all samples using the RainDrop system, data from cluster plots were analyzed with RainDrop Analyst following standard procedures. Positive control from cell-line bearing mutant allele was used as a control sample to set the gates.(22) These gates were applied across all samples evaluated with each assay.

261

CtDNA monitoring

To evaluate the predictive value of ctDNA, we monitored a subgroup of patients (n=8), at the time of inclusion and at different time points during first-line treatment. Then, we compared ctDNA levels and radiological findings during oncological follow-up.

Statistical analysis

The demographic, pre-, and perioperative characteristics of patients were compared by the Chi-square or Fisher's exact test. Continuous data were analyzed with the independent-samples t-test. The cut-off date for analysis was October 2015. Survival rates were calculated using the Kaplan-Meier method.(25) Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis until death from any cause. Disease free survival (DFS) was calculated from the date of surgery until first recurrence or death.

The Cox proportional-hazards regression model was used to perform univariate and multivariate analyses with 95% confidence interval (CI). Multivariate analysis was performed with variables associated with the outcome in univariate analysis at a P value of < 0.1. All statistical analyses were performed using SPSS software version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). A *P* value \leq 0.05 was considered as significant.

RESULTS

Study population

One hundred and thirty-five patients with resectable (n=31; 23%), locally advanced (n=36; 27%) or metastatic (n=68; 50%) PAC were included in this prospective study (**Table 1**). Median age of patients was 65.6 years (range 39.2-87.3). There was no difference between the 3 groups in demographic and biological characteristics excepted for baseline CA 19-9 (P<0.001). Median coverage depth of sequencing was 5,813 reads (range 842-15,803). Mean and standard deviation of free plasma DNA concentration was 92 ± 201 ng/mL, with 52.5 ± 79.5 ng/mL in patients with resectable tumor, and 105.8 ± 227.25 ng/mL in advanced PAC (P=0.05).

DNA Sequencing

In patients with advanced PAC (n=104), 50 (48%) of them had ctDNA detectable by at least one cancer specific gene mutation with a MAF of 6.1% (range 0.1-65.4). Among them, 43 (41.3%) had a *KRAS* mutation (G12D n=18; G12V n=18; G12R n=4; G12C n=1; Q61H n=2). *TP53, SMAD4, NRAS, PIK3CA* and *STK11* gene mutations were detected in 23, 8, 2, 1 and 1 cases, respectively. In the group of patients with detectable ctDNA, 43 (86%) had a *KRAS* mutation, and 27 (54%) had at least 2 mutations detected (**Figure 1**). CtDNA detection was strongly correlated to grade of tumor differentiation: 65% of patients in cases of undifferentiated tumors vs. 58% in moderately differentiated vs. only 30% in well-differentiated tumors (P=0.036 and P=0.042). Median CA19-9 was 380 UI/mL in patients with undetectable and 2748 UI/mL in patients with detectable ctDNA (P=0.015). Forty-four patients (64.7%) with metastatic disease had detectable ctDNA in comparison to only 6 patients (16.6%) with locally advanced PAC (P<0.001). In the subgroup of metastatic patients, no significant correlation was found between presence of ctDNA and the number of metastatic sites (P=0.13).

In patients who had curative resection (n=31), ctDNA was detected in 6 of them (19%), with a median MAF of 4.4% (range 0.7-8.7). *TP53* mutation was observed in 4 cases, *KRAS* and *TP53* mutations in 1 case and ERBB4 mutation in 1 case.

Correlation between NGS and dPCR

All *KRAS* mutations detected by NGS were confirmed by droplet-based dPCR in microfluidics. One patient, considered as negative after NGS was detected positive in dPCR for the *KRAS* G12D mutation, with a MAF of 0.61%. Correlation between the two technics revealed a high concordance with R^2 of 0.94 (**Supplementary Data File 2**).

Prognostic Value of ctDNA in advanced PAC

After a median follow-up of 34.2 months, 76 patients died (73.1%). Presence of ctDNA was strongly correlated with poor OS (6.5 versus 19.0 months; log-rank P<0.001) in patients with advanced PAC (**Figure 2A**).

To evaluate the impact of ctDNA level, patients were grouped according to mutation allelic ratio tertiles. Patients with the higher MAF had the worst OS (**Figure 2B**). The OS decreased from 18.9, 7.8 and 4.9 months (log-rank P<0.001) according to the different MAF tertiles. In multivariate analysis, including ctDNA, age, gender and stage disease, ctDNA was independently associated with poor OS (HR=1.96; Cl_{95%} [1.20-3.20]; P=0.007) (**Table 2**).

Twenty-seven patients (54%) had at least 2 mutations detected. To evaluate the impact of presence of multiple mutations, patients were divided in two groups: « *KRAS* only » or « *KRAS* + other » when *KRAS* mutation was associated with at least another mutation. There was a trend to demonstrate that patients with multiple mutations had a worse prognosis, but the difference was not statistically significant (median overall survival 3.1 vs. 8.6 months; P=0.128; see **Supplementary Data File 3**).

Similarly, in the subgroup of patients with *KRAS* mutation, no significant difference in overall survival was observed according to the type of *KRAS* mutation: *KRAS* G12V vs.

others: median overall survival 4.9 vs. 9.0 months (P=0.507); *KRAS* G12D vs. others: 4.9 vs. 5.5 months (P=0.594).

Preliminary data of monitoring ctDNA in 8 patients suggest that evolution of ctDNA levels was correlated with chemotherapy efficacy and objective radiological response (see **Supplementary Data File 4**).

Prognostic Value of ctDNA in resected patients

After a median follow-up of 33.3 months, tumor relapse occurred in 23 patients, 13 of them died. Median delay between surgical resection and blood sample collection was 60.5 days (range 37-123). All patients with detectable ctDNA (n=6) present positive lymph nodes and 5 of them had a pT3 tumor.

In this subgroup of resected patients, those with undetectable ctDNA after surgery had a longer DFS (17.6 versus 4.6 months; log-rank P=0.03), and a longer OS (32.2 versus 19.3; P=0.027) than those with detectable ctDNA (**Figure 3A and 3B**). Among 6 patients with detectable ctDNA, tumor relapse occurred in 4 patients. Progression using ctDNA was detected at an average of 2.4 months compared with 4.0 months using standard CT scan (P=0.043).

DISCUSSION

In this series, we showed that ctDNA can improve the prognostic staging of metastatic and locally advanced PAC. Our work highlights that the detection and evaluation of the quantity of ctDNA appears as an independent prognostic factor in stage III or IV PAC, and a prognostic factor of recurrence in resected patients when detected after surgery.

Somatic mutations were analyzed in plasma DNA samples by NGS without any information on primary tumor mutational status. All *KRAS* mutations were also validated with picoliter droplets digital PCR that present both high sensitivity and lower cost but allowed to screen for lower number of mutations. A strong correlation was observed between the AF measured by both approaches suggesting that our NGS strategy led to quantitative results. In pancreatic cancer patients the gain of optimized NGS as compared to dPCR is around 15% of the cases (ie. patients with a pancreatic cancer without KRAS mutations). The use of one or the other is linked to the workflow of the laboratory. Our results in terms of sensitivity are similar, and its improvement goes through a testing of an increased quantity of plasma DNA analysis. In dPCR, higher quantity of DNA could be used and a higher sensitivity could thus be reached. We indeed previously described sensitivity of up to 0.0005%. However, only 6µl of DNA was available for droplet based digital PCR analysis. The use of a higher quantity of plasma DNA could have allowed the detection of a higher fraction of patients with KRAS mutated ctDNA.

Bettegowda *et al.* reported that ctDNA somatic mutation can be detected in >50% of patients with several cancers, including PAC, even in a localized stage.(12) Moreover, Sausen *et al.* recently demonstrated that mutations detected on tumor specimen from 22 patients were detectable in the plasma at diagnosis with a specificity >99.9% confirming that the mutated fraction of circulating DNA arise from tumor tissues.(16) Although all our patients had histologically proven PAC, only 48% had detectable ctDNA in advanced subgroup. Focusing on metastatic patients, this rate increased to 64.7%. These results are consistent with Kinugasa *et al.*'s cohort of 66 PAC patients screened on *KRAS* mutations, reporting

54.5% (n=36) of detectable ctDNA in blood samples despite an important part of metastatic diseases in their cohort (n=57).(26) However, Bettegowda et al. reported a higher ctDNA detection rate in metastatic PDAC with nearly 90% of patients with detectable ctDNA. This discrepancy may be explained by methodological differences and, most important quantity of DNA sequenced in each assay in their study.(19)

The development and growth of PAC involves oncogene activation or loss of tumor suppressor genes function.(27,28) *KRAS* is the most common and one of the driver of mutation in PAC. *KRAS* mutation was the most frequently detected in our cohort, isolated or associated with other genes alterations, and present in 86% of patients with ctDNA detected. Our findings in blood are concordant with those previously published from PAC tissue, which report a rate of *KRAS* mutation in PAC of about 80-90%.(16,26) We retrospectively assessed the *KRAS* and *TP53* tumor status in 20 tumor samples. We found an agreement between tumor tissue and plasma ctDNA in 19 out 20 couples tested (95%) both for *KRAS* and *TP53*. The 2 discordant cases (one for KRAS, one for TP53) were positive in plasma negative in tumors suggesting sampling problem owing to biopsy from a unique metastatic site (data not shown).

Some authors demonstrated that gender, chronic inflammation, age or tumor heterogeneity could influence the level of ctDNA.(29) In this series, most of patients with detectable ctDNA had moderate or undifferentiated tumors (p=0.037). Tumor differentiation thus seems to impact the ctDNA level in PAC. Although we did not observe a significant correlation between the number of metastatic sites and the presence of ctDNA, we cannot exclude a relation between the tumor mass and the presence of ctDNA. The presence of a pancreatic metastatic disease is not synonymous of presence of ctDNA in patients' plasma. More than tumor mass, presence of ctDNA seems correlated with differentiation grade and could more reflect tumor aggressiveness than tumor burden.

One of the important results in our study was the prognostic value of the presence and level of ctDNA. In advanced subgroup, ctDNA was an independent prognostic biomarker of OS (HR=1.94; P=0.007). The presence of ctDNA after surgery appeared to be a

267

prognostic factor of poor DFS and OS. Chen *et al.* have previously described the prognostic value of this biomarker in PAC.(20) In their series, the presence of *KRAS* mutation in plasma was correlated with poor OS (3.9 vs. 10.2 months; P<0.001) in non-resectable patients. More recently, Sausen *et al.* reported that, in resectable patients, ctDNA was a prognostic factor of early tumor relapse if detected before surgery (Log Rank P=0.015). In this study, in a subgroup of 20 patients collected after surgical resection, detectable ctDNA was also a prognostic biomarker of DFS (9.9 months vs. median not reached; Log Rank P=0.02).(16)

Although, in resected patients, the presence of ctDNA after resection could suggest the existence of a micro-metastasis disease, studies are needed to determine if the presence of ctDNA may be used for early detection of PAC. Based on our results we make the educated guess that the detection of small pancreatic tumors will be difficult without improving the quantity of input DNA and consequently the volume of plasma used for this purpose.

Although the blood samples of our patients are prospectively and consecutively collected the study presents heterogeneity in treatments received owing to difference in age, treatment tolerance, or performance status of patients. This heterogeneity could induce a bias in the results even if multivariate analysis confirmed the prognostic value of ctDNA. Secondly, our monitoring results are preliminary without perfect concordance between sample collection and radiological evaluation of patients for example. In the resectable subgroup, there is a lack in pre-operative ctDNA data. Indeed, patients were collected at the first cycle of adjuvant treatment, and our protocol did not include samples before surgery. Finally, despite careful collection and storage of samples, and the use of highly sensitive methods to detect genetic changes, some alterations may not have been detected due to limited plasmatic DNA amounts or very low mutant allele frequency.

268

CONCLUSION

This study demonstrates that ctDNA can be detected in peripheral blood in PAC, and that it appears as an independent prognostic marker of overall survival in locally advanced or metastatic diseases. Furthermore, it arises as an indicator of shorter disease free and overall survivals in resected patients when detected after surgery. The describe procedure may have great potential as new simple and non-invasive strategy for patient's care and followup. Further investigations are needed to confirm these results and its usefulness in the prognosis and in-risk group screening of patients.

Moreover, ctDNA would be of great interest: 1/ to allow a rapid molecular analysis for inclusion in "molecular" trials with targeted therapies, 2/ for initial diagnosis in case of difficulty to obtain an histological proof.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Armelle Bardier-Dupas from department of Pathology, (Pitié-Salpêtrière Hospital, Sorbonne University, UPMC University, Paris 06, France) for her clinical and technical implication in tumor and blood-samples matching.

M. Daniel Pietrasz thanks the Fondation d'Aide et Recherche en Cancerologie Digestive (A.R.CA.D).

REFERENCES

- Eheman C, Henley SJ, Ballard-Barbash R, Jacobs EJ, Schymura MJ, Noone AM, et al. Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2008, featuring cancers associated with excess weight and lack of sufficient physical activity. Cancer 2012;118:2338-66.
- Bouvier AM, Remontet L, Jougla E, Launoy G, Grosclaude P, Buemi A, et al. Incidence of gastrointestinal cancers in France. Gastroenterologie clinique et biologique 2004;28:877-81.
- 3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA: a cancer journal for clinicians 2015;65:5-29.
- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. The New England journal of medicine 2011;364:1817-25.
- 5. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. The New England journal of medicine 2013;369:1691-703.
- Poruk KE, Gay DZ, Brown K, Mulvihill JD, Boucher KM, Scaife CL, et al. The clinical utility of CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates. Curr Mol Med 2013;13:340-51.
- 7. Hong SM, Park JY, Hruban RH, Goggins M. Molecular signatures of pancreatic cancer. Archives of pathology & laboratory medicine 2011;135:716-27.
- Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. Nature 2015;518:495-501.
- 9. di Magliano MP, Logsdon CD. Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. Gastroenterology 2013;144:1220-9.
- Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2003;21:3902-8.
- Gal S, Fidler C, Lo YM, Taylor M, Han C, Moore J, et al. Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. British journal of cancer 2004;90:1211-5.
- 12. 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;6:224ra24.

- Spindler KL, Pallisgaard N, Vogelius I, Jakobsen A. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2012;18:1177-85.
- Spindler KL, Appelt AL, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Cellfree DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. International journal of cancer Journal international du cancer 2014;135:2984-91.
- 15. Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2015.
- Sausen M, Phallen J, Adleff V, Jones S, Leary RJ, Barrett MT, et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. Nature communications 2015;6:7686.
- Marchese R, Muleti A, Pasqualetti P, Bucci B, Stigliano A, Brunetti E, et al. Low correspondence between K-ras mutations in pancreatic cancer tissue and detection of K-ras mutations in circulating DNA. Pancreas 2006;32:171-7.
- Dabritz J, Preston R, Hanfler J, Oettle H. Follow-up study of K-ras mutations in the plasma of patients with pancreatic cancer: correlation with clinical features and carbohydrate antigen 19-9. Pancreas 2009;38:534-41.
- Kinugasa H, Nouso K, Miyahara K, Morimoto Y, Dohi C, Tsutsumi K, et al. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. Cancer 2015;121:2271-80.
- 20. Chen H, Tu H, Meng ZQ, Chen Z, Wang P, Liu LM. K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer. European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology 2010;36:657-62.
- 21. Tops BB, Normanno N, Kurth H, Amato E, Mafficini A, Rieber N, et al. Development of a semi-conductor sequencing-based panel for genotyping of colon and lung cancer by the Onconetwork consortium. BMC cancer 2015;15:26.
- 22. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, Le Corre D, Mazutis L, Salem CB, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. Lab on a chip 2011;11:2156-66.
- 23. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated

with cetuximab. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2008;26:374-9.

- 24. Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. Clinical chemistry 2013;59:1722-31.
- 25. Bonnetain F, Bonsing B, Conroy T, Dousseau A, Glimelius B, Haustermans K, et al. Guidelines for time-to-event end-point definitions in trials for pancreatic cancer. Results of the DATECAN initiative (Definition for the Assessment of Time-to-event End-points in CANcer trials). European journal of cancer 2014;50:2983-93.
- 26. Kinugasa H, Nouso K, Miyahara K, Morimoto Y, Dohi C, Tsutsumi K, et al. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. Cancer 2015.
- 27. Goggins M, Kern SE, Offerhaus JA, Hruban RH. Progress in cancer genetics: lessons from pancreatic cancer. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 1999;10 Suppl 4:4-8.
- 28. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. Nature reviews Cancer 2002;2:897-909.
- 29. Gall TM, Frampton AE, Krell J, Castellano L, Jiao LR. Circulating molecular markers in pancreatic cancer: ready for clinical use? Future oncology 2013;9:141-4.

Table 1.

Variable	Total	Pagastables		Motoototioo	n
variable	n = 135	Resectables n = 31	LA n = 36	n = 68	μ
Sox					200
Mala	95 (620/)	17 (600/)	24 (660/)	AA (650/)	115
	00 (00%)	17 (02%)	24 (00%)	44 (05%)	
Female	50 (37%)	14 (38%)	12 (34%)	24 (35%)	
Age, median (range), yr	65.6 (39.2-87.3)	67.9 (46.0-85.1)	64.7 (40.5-84.6)	66.9 (39.2-87.3)	ns
Body Mass Index, (range), kg/m ²	23.3 (14.5-42.3)	24.3 (19.1-32.5)	24.3 (16.7-38.2)	22.2 (14.5-42.3)	
Tumor location	· · · ·	· · · · ·	· · · · ·	· · · ·	
Head and isthmus	94 (70%)	24 (77%)	24 (67%)	46 (68%)	
Body	18 (13%)	3 (10%)	5 (14%)	10 (15%)	
Tail	23 (17%)	4 (13%)	7 (19%)	12 (17%)	
Differentiation grade (n=98)	· · ·	, , ,	· · ·	· · ·	
Well	31 (32%)	11 (35%)	10 (43%)	10 (23%)	
Moderate	39 (40%)	10 (32.5%)	7 (31%)	22 (50%)	
Poor	28 (28%)	10 (32.5%)	6 (26%)	12 (27%)	
Baseline CA 19-9, median	238.0	26.0	179.0	2748.0	<0.001
(range), UI/mL	(0.6-636000)	(0.6-2225)	(1.0-10970)	(1.5-636000)	
LA indicates locally advanced tumo	Drs		· ·	· ·	

TABLE 1. Demographic and clinicopathologic characteristics of study population

Table 2. Prognostic factors for overall survival at univariate and multivariate analysis in advanced PAC

N° patients	Hazard ratio (95%	D valua		
N=104	CI)	F-Value	Hazard ratio (95% CI)	P-value
	1.05 (0.99 - 1.04)	0.249	1.01 (0.97 – 1.04)	0.608
66	0.74 (0.45 – 1.19)	0.207	0,65 (0.38 – 1.16)	0.147
68	3.22 (1.90 – 5.45)	<0.001	2,87 (1.52 – 5.42)	<0.001
59	1.33 (0.78 – 2.27)	0.30	1.14 (0.65 – 2.00)	0.64
50	2.24 (1.41 – 3.54)	0.001	1.99 (1.13 – 3.50)	0.016
			•	
	66 68 59 50	$\begin{array}{c ccccc} & 1.05 & (0.99 - 1.04) \\ \hline & 1.05 & (0.45 - 1.19) \\ \hline & 68 & 3.22 & (1.90 - 5.45) \\ \hline & 59 & 1.33 & (0.78 - 2.27) \\ \hline & 50 & 2.24 & (1.41 - 3.54) \\ \hline & 0ccarcinoma \\ \hline \end{array}$	1.05 $(0.99 - 1.04)$ 0.249 66 0.74 $(0.45 - 1.19)$ 0.207 68 3.22 $(1.90 - 5.45)$ <0.001 59 1.33 $(0.78 - 2.27)$ 0.30 50 2.24 $(1.41 - 3.54)$ 0.001	1.040.10.2491.01 $(0.97 - 1.04)$ 1.05 $(0.99 - 1.04)$ 0.2491.01 $(0.97 - 1.04)$ 660.74 $(0.45 - 1.19)$ 0.2070,65 $(0.38 - 1.16)$ 68 3.22 (1.90 - 5.45) <0.001

TABLE 2. Prognostic factors for disease-free survival at univariate and multivariate analysis in advanced PAC

ctDNA indicates circulating tumor DNA

Figure legends:

Figure 1. Mutated genes distribution in advanced patients with detectable ctDNA.

Figure 2. Survival curves according to detectable ctDNA in advanced patients (A) Overall survival (B) Overall survival according to ctDNA tertile

Figure 3. Survival curves according to detectable ctDNA in resected patients. (A) Disease Free Survival (B) Overall survival

Figure 1.







·	0 mo	6 mo	12 mo	18 mo	24 mo	30 mo	36 mo	42 mo
ctDNA undectectble	54	38	27	18	8	5	2	0
ctDNA detectable	50	22	10	6	4	3	2	1





Number of patients at risk

	0 mo	6 mo	12 mo	18 mo	24 mo	30 mo	36 mo	42 mo	
Lower tertile	54	38	27	18	8	5	2	0	
Middle tertile	25	11	5	4	3	2	2	1	
Higher tertile	25	11	5	2	1	1	0	0	







I	0 mo	6 mo	12 mo	18 mo	24 mo	30 mo	36 mo	42 mo	48 mo
ctDNA undetectable	25	21	16	9	6	4	3	2	1
ctDNA detectable	6	2	1	1	0	0	0	0	0





	0 mo	6 mo	12 mo	18 mo	24 mo	30 mo	36 mo	42 mo	48 mo
ctDNA undetectable	25	24	21	17	13	7	4	1	1
ctDNA detectable	6	4	2	1	0	0	0	0	0

REFERENCES

- 1. Sawyers, C. L. The cancer biomarker problem. *Nature* **452**, 548–52 (2008).
- 2. Ahmed, A. A. & Abedalthagafi, M. Cancer diagnostics: the journey from histomorphology to molecular profiling. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.11061
- 3. Gustavsson, B. *et al.* A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **14**, 1–10 (2015).
- 4. Xu, W. *et al.* Survival benefit and safety of the combinations of FOLFOXIRI ± bevacizumab versus the combinations of FOLFIRI ± bevacizumab as first-line treatment for unresectable metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Onco. Targets. Ther.* **9**, 4833–42 (2016).
- 5. Lledo, G. *et al.* Chemoradiotherapy with FOLFOX plus cetuximab in locally advanced oesophageal cancer: The GERCOR phase II trial ERaFOX. *Eur. J. Cancer* **56**, 115–21 (2016).
- 6. Lièvre, A. *et al.* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* **66**, 3992–5 (2006).
- 7. Diaz, L. A. *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* **486**, 537–40 (2012).
- 8. Goldstein, M. J. & Mitchell, E. P. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest.* **23**, 338–51 (2005).
- 9. Sölétormos, G. *et al.* Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer: Updated Guidelines From the European Group on Tumor Markers. *Int. J. Gynecol. Cancer* **26**, 43–51 (2016).
- 10. INCA. Classification TNM. at <www.e-cancer.fr>
- 11. European Medicines Agency (EMA). EMA. at <http://www.ema.europa.eu/>
- 12. Eisenhauer, E. A. *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer* **45**, 228–47 (2009).
- 13. Harmer, M., Denoix, P. & Hamperl, H. The TNM-system. Aktuelle Probl. Chir. 14, 25–36 (1970).
- 14. SNFGE. Société savante médicale française d'hépato-gastroentérologie et d'oncologie digestive. at http://www.snfge.org/content/3-cancer-du-colon
- 15. (INCA), I. N. du C. Cancer Staging National Cancer Institute. at ">http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>
- 16. AJCC. AJCC 7ème édition. at https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Documents/ColonLarge.pdf
- 17. Li, J. *et al.* TNM staging of colorectal cancer should be reconsidered by T stage weighting. *World J. Gastroenterol.* **20**, 5104–12 (2014).
- 18. Wittekind, C. The development of the TNM classification of gastric cancer. *Pathol. Int.* **65**, 399–403 (2015).
- 19. Tafe, L. J., Steinmetz, H. B., Allen, S. F., Dokus, B. J. & Tsongalis, G. J. Rapid fluorescence in situ hybridisation (FISH) for HER2 (ERBB2) assessment in breast and gastro-oesophageal cancer. *J. Clin. Pathol.* **68**, 306–8 (2015).
- MacConaill, L. E., Van Hummelen, P., Meyerson, M. & Hahn, W. C. Clinical implementation of comprehensive strategies to characterize cancer genomes: opportunities and challenges. *Cancer Discov.* 1, 297–311 (2011).
- Grade, M., Difilippantonio, M. J. & Camps, J. Patterns of Chromosomal Aberrations in Solid Tumors. Recent results cancer Res. Fortschritte der Krebsforsch. Progrès dans les Rech. sur le cancer 200, 115– 42 (2015).
- 22. de Pagter, M. S. & Kloosterman, W. P. The Diverse Effects of Complex Chromosome Rearrangements and Chromothripsis in Cancer Development. *Recent results cancer Res. Fortschritte der Krebsforsch. Progrès dans les Rech. sur le cancer* **200**, 165–93 (2015).
- Yamada, O. *et al.* Emergence of a BCR-ABL Translocation in a Patient With the JAK2V617F Mutation: Evidence for Secondary Acquisition of BCR-ABL in the JAK2V617F Clone. *J. Clin. Oncol.* 32, e76–e79 (2014).
- 24. Li, Y. *et al.* Constitutional and somatic rearrangement of chromosome 21 in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **508**, 98–102 (2014).
- 25. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Gatekeepers and caretakers. *Nature* **386**, 761–763 (1997).
- 26. Hutchins, G. *et al.* Value of Mismatch Repair, KRAS, and BRAF Mutations in Predicting Recurrence and Benefits From Chemotherapy in Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1261–1270 (2011).
- 27. Walther, A., Houlston, R. & Tomlinson, I. Association between chromosomal instability and prognosis in

colorectal cancer: a meta-analysis. Gut 57, 941-50 (2008).

- 28. Harada, K. *et al.* LINE-1 methylation level and patient prognosis in a database of 208 hepatocellular carcinomas. *Ann. Surg. Oncol.* **22**, 1280–7 (2015).
- 29. Mima, K. *et al.* Tumor LINE-1 methylation level and colorectal cancer location in relation to patient survival. *Oncotarget* **5**, (2016).
- 30. Buj, R. *et al.* Quantification of Unmethylated Alu (QUAlu): a tool to assess global hypomethylation in routine clinical samples. *Oncotarget* **7**, 10536–10546 (2016).
- 31. Esteller, M. & Herman, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.* **196**, 1–7 (2002).
- 32. Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B. & Herman, J. G. A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Res.* **61**, 3225–3229 (2001).
- Liu, B. *et al.* Promoter methylation status of tumor suppressor genes and inhibition of expression of DNA methyltransferase 1 in non-small cell lung cancer. *Exp. Biol. Med.* (2016). doi:10.1177/1535370216645211
- 34. Robertson, K. D. DNA methylation and human disease. Nat. Rev. Genet. 6, 597–610 (2005).
- 35. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
- 36. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
- 37. Hanahan, D. *et al.* The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
- 38. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646–674 (2011).
- Liu, Y. & Cao, X. Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis. J. Mol. Med. (Berl).
 94, 509–22 (2016).
- 40. Tobergte, D. R. & Curtis, S. *Biomarqueurs en oncologie. Journal of Chemical Information and Modeling* **53**, (2013).
- 41. Gatenby, R. A. & Vincent, T. L. An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Res.* **63**, 6212–20 (2003).
- 42. Guinney, J. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat. Med. 21, 1350–6 (2015).
- Becht, E. *et al.* Immune and stromal classification of colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* (2016). doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2879
- 44. Marisa, L. *et al.* Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* **10**, e1001453 (2013).
- 45. Perkins, G. & Laurent-Puig, P. [Colorectal cancer biology]. Rev. Prat. 65, 802–6 (2015).
- 46. Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**, 623–627 (1997).
- 47. Webber, E. M., Kauffman, T. L., O'Connor, E. & Goddard, K. A. B. Systematic review of the predictive effect of MSI status in colorectal cancer patients undergoing 5FU-based chemotherapy. *BMC Cancer* **15**, 156 (2015).
- 48. Veigl, M. L. *et al.* Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8698–702 (1998).
- 49. Trautmann, K. *et al.* Chromosomal instability in microsatellite-unstable and stable colon cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6379–85 (2006).
- 50. Weisenberger, D. J. *et al.* Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. *Mol. Cancer Res.* **2**, 62–72 (2004).
- 51. Vogelstein, B. et al. Cancer genome landscapes. Science 339, 1546–58 (2013).
- 52. Cancer Genome Atlas Network, T. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, (2012).
- 53. Dallol, A. *et al.* Clinical significance of frequent somatic mutations detected by high-throughput targeted sequencing in archived colorectal cancer samples. *J. Transl. Med.* **14**, 118 (2016).
- 54. MyCancerGenome. Molecular Profiling of Colorectal Cancer. at https://www.mycancergenome.org/content/disease/colorectal-cancer/
- 55. Vilar, E. & Gruber, S. B. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 153–62 (2010).
- 56. Waring, P. *et al.* RAS Mutations as Predictive Biomarkers in Clinical Management of Metastatic Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **15**, 95–103 (2016).
- 57. Jackson, S. E. & Chester, J. D. Personalised cancer medicine. Int. J. Cancer 137, 262–266 (2015).
- Khambata-Ford, S. *et al.* Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 25, 3230–7 (2007).

- 59. Hsu, H.-C. *et al.* Mutations of KRAS/NRAS/BRAF predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget* **7**, 22257–22270 (2016).
- 60. Mansi Laura, Viel Erika, Curtit Elsa, Medioni Jacques & Le Tourneau Christophe. Ciblage de la voie de signalisation RAS pour le traitement des cancers.
- 61. Di Fiore, F. *et al.* Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166–9 (2007).
- 62. Douillard, J.-Y., Rong, A. & Sidhu, R. RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2159–60 (2013).
- 63. De Roock, W., De Vriendt, V., Normanno, N., Ciardiello, F. & Tejpar, S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet. Oncol.* **12**, 594–603 (2011).
- 64. Frattini, M. *et al.* PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer* **97**, 1139–45 (2007).
- 65. Therkildsen, C., Bergmann, T. K., Henrichsen-Schnack, T., Ladelund, S. & Nilbert, M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *http://dx.doi.org/10.3109/0284186X.2014.895036* (2014).
- 66. Di Gioia, D., Blankenburg, I., Nagel, D., Heinemann, V. & Stieber, P. Tumor markers in the early detection of tumor recurrence in breast cancer patients: CA 125, CYFRA 21-1, HER2 shed antigen, LDH and CRP in combination with CEA and CA 15-3. *Clin. Chim. Acta.* **461**, 1–7 (2016).
- 67. Liang, Y. *et al.* Clinical significance and diagnostic value of serum CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with gastric cancer. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.10391
- 68. Tsao, S. C.-H. *et al.* Monitoring response to therapy in melanoma by quantifying circulating tumour DNA with droplet digital PCR for BRAF and NRAS mutations. *Sci. Rep.* **5**, 11198 (2015).
- 69. Lee, S. *et al.* Early α-fetoprotein response predicts survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *J. Hepatocell. carcinoma* **2**, 39–47 (2015).
- 70. Golubnitschaja, O. & Sridhar, K. C. Liver metastatic disease: new concepts and biomarker panels to improve individual outcomes. *Clin. Exp. Metastasis* (2016). doi:10.1007/s10585-016-9816-8
- 71. Overman, M. J. *et al.* Use of Research Biopsies in Clinical Trials: Are Risks and Benefits Adequately Discussed? *J. Clin. Oncol.* **31**, 17–22 (2013).
- 72. Gerlinger, M. *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**, 883–92 (2012).
- 73. Spindler, K.-L. G. *et al.* Clinical utility of KRAS status in circulating plasma DNA compared to archival tumour tissue from patients with metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor therapy. *Eur. J. Cancer* **51**, 2678–85 (2015).
- 74. Siravegna, G. *et al.* Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat. Med.* **21**, 795–801 (2015).
- 75. Marcq, M., Vallée, A., Bizieux, A. & Denis, M. G. Detection of EGFR mutations in the plasma of patients with lung adenocarcinoma for real-time monitoring of therapeutic response to tyrosine kinase inhibitors? *J. Thorac. Oncol.* **9**, e49-50 (2014).
- 76. Holdenrieder, S. Biomarkers along the continuum of care in lung cancer. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **76**, S40–S45
- Gold, B., Cankovic, M., Furtado, L. V, Meier, F. & Gocke, C. D. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology. *J. Mol. Diagn.* 17, 209–24 (2015).
- 78. Brock, G., Castellanos-Rizaldos, E., Hu, L., Coticchia, C. & Skog, J. Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *Transl. Cancer Res.* **4**, 280–290 (2015).
- 79. Kang, Y. & Pantel, K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell* 23, 573–81 (2013).
- 80. Allard, W. J. *et al.* Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6897–904 (2004).
- 81. Kang, Y. & Pantel, K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell* 23, 573–81 (2013).
- 82. Janni, W. *et al.* The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence. *Cancer* **103**, 884–91 (2005).
- 83. Braun, S. *et al.* Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **342**, 525–33 (2000).
- 84. Bidard, F.-C. *et al.* Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet. Oncol.* **15**, 406–14 (2014).

- 85. Helissey, C. *et al.* Circulating tumor cell thresholds and survival scores in advanced metastatic breast cancer: the observational step of the CirCe01 phase III trial. *Cancer Lett.* **360**, 213–8 (2015).
- 86. Janni, W. J. *et al.* Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **22**, 2583–93 (2016).
- 87. Bidard, F.-C., Proudhon, C. & Pierga, J.-Y. Circulating tumor cells in breast cancer. *Mol. Oncol.* **10**, 418–430 (2016).
- 88. Ligthart, S. T. *et al.* Circulating Tumor Cells Count and Morphological Features in Breast, Colorectal and Prostate Cancer. *PLoS One* **8**, e67148 (2013).
- 89. Toyoshima, K. *et al.* Analysis of circulating tumor cells derived from advanced gastric cancer. *Int. J. Cancer* **137**, 991–998 (2015).
- 90. Denis, J. A. *et al.* Droplet digital PCR of circulating tumor cells from colorectal cancer patients can predict KRAS mutations before surgery. *Mol. Oncol.* **0**, 57–62 (2016).
- 91. Pantel, K. & Alix-Panabières, C. Functional Studies on Viable Circulating Tumor Cells. *Clin. Chem.* **62**, 328–34 (2016).
- 92. Hofman, V. J., Ilie, M. & Hofman, P. M. Detection and characterization of circulating tumor cells in lung cancer: Why and how? *Cancer Cytopathol.* **124**, 380–387 (2016).
- 93. Ligthart, S. T. *et al.* Circulating Tumor Cells Count and Morphological Features in Breast, Colorectal and Prostate Cancer. *PLoS One* **8**, e67148 (2013).
- 94. Hou, H. W. *et al.* Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Sci. Rep.* **3**, 1259 (2013).
- 95. Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* **14**, 57–62 (2013).
- 96. Jin, C. *et al.* Technologies for label-free separation of circulating tumor cells: from historical foundations to recent developments. *Lab Chip* **14**, 32–44 (2014).
- 97. Krebs, M. G. *et al.* Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with nonsmall-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1556–63 (2011).
- 98. Alix-Panabières, C. *et al.* Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* **14**, 57–62 (2014).
- 99. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–83 (2013).
- 100. Théry, C., Ostrowski, M. & Segura, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581–93 (2009).
- 101. Katsuda, T., Kosaka, N. & Ochiya, T. The roles of extracellular vesicles in cancer biology: Toward the development of novel cancer biomarkers. *Proteomics* **14**, 412–425 (2014).
- 102. Schorey, J. S. & Bhatnagar, S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* **9**, 871–81 (2008).
- 103. Brinton, L. T., Sloane, H. S., Kester, M. & Kelly, K. A. Formation and role of exosomes in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 659–671 (2015).
- Silva, M. & Melo, S. A. Non-coding RNAs in Exosomes: New Players in Cancer Biology. *Curr. Genomics* 16, 295–303 (2015).
- 105. Matsumura, T. *et al.* Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **113**, 275–81 (2015).
- 106. Zhang, L. *et al.* Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature* **527**, 100–4 (2015).
- 107. Chen, W.-X. *et al.* Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs. *Tumour Biol.* **35**, 9649–59 (2014).
- 108. Mao, L. *et al.* Exosomes decrease sensitivity of breast cancer cells to adriamycin by delivering microRNAs. *Tumour Biol.* **37**, 5247–56 (2016).
- 109. Li, M. *et al.* Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **369**, (2014).
- 110. Skog, J. *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1470–6 (2008).
- 111. Hong, B. S. *et al.* Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics* **10**, 556 (2009).
- 112. Muller, L. *et al.* Exosomes isolated from plasma of glioma patients enrolled in a vaccination trial reflect antitumor immune activity and might predict survival. *Oncoimmunology* **4**, e1008347 (2015).
- 113. Lopatina, T., Gai, C., Deregibus, M. C., Kholia, S. & Camussi, G. Cross Talk between Cancer and Mesenchymal Stem Cells through Extracellular Vesicles Carrying Nucleic Acids. *Front. Oncol.* **6**, 125

(2016).

- 114. Kahlert, C. *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. *J. Biol. Chem.* **289**, 3869–75 (2014).
- 115. Pitt, J. M. *et al.* Extracellular vesicles: masters of intercellular communication and potential clinical interventions. *J. Clin. Invest.* **126**, 1139–1143 (2016).
- 116. Whiteside, T. L. *et al.* Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *J. Clin. Invest.* **126**, 1216–1223 (2016).
- 117. Melo, S. A. *et al.* Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* **26**, 707–21 (2014).
- 118. Chi, K. R. The tumour trail left in blood. *Nature* 532, 269 (2016).
- Cheng, G. Circulating miRNAs: Roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 81, 75–93 (2015).
- 120. Turchinovich, A., Weiz, L. & Burwinkel, B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 460–5 (2012).
- 121. Tiberio, P., Callari, M., Angeloni, V., Daidone, M. G. & Appierto, V. Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers. *Biomed Res. Int.* **2015**, 731479 (2015).
- 122. McDonald, J. S., Milosevic, D., Reddi, H. V., Grebe, S. K. & Algeciras-Schimnich, A. Analysis of Circulating MicroRNA: Preanalytical and Analytical Challenges. *Clin. Chem.* **57**, 833–840 (2011).
- 123. Dong, Y. *et al.* MicroRNA dysregulation in colorectal cancer: a clinical perspective. *Br. J. Cancer* **104**, 893–8 (2011).
- 124. Chen, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* **18**, 997–1006 (2008).
- 125. Wang, R. *et al.* Circulating microRNAs as a novel class of diagnostic biomarkers in gastrointestinal tumors detection: a meta-analysis based on 42 articles. *PLoS One* **9**, e113401 (2014).
- 126. Yan, L. *et al.* A Comprehensive Meta-Analysis of MicroRNAs for Predicting Colorectal Cancer. *Medicine* (*Baltimore*). **95**, e2738 (2016).
- 127. Kleivi Sahlberg, K. *et al.* A serum microRNA signature predicts tumor relapse and survival in triplenegative breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **21**, 1207–14 (2015).
- 128. Al-Khanbashi, M. *et al.* Tissue and Serum miRNA Profile in Locally Advanced Breast Cancer (LABC) in Response to Neo-Adjuvant Chemotherapy (NAC) Treatment. *PLoS One* **11**, e0152032 (2016).
- 129. Cheng, D.-L., Xiang, Y.-Y., Ji, L. & Lu, X.-J. Competing endogenous RNA interplay in cancer: mechanism, methodology, and perspectives. *Tumour Biol.* **36**, 479–88 (2015).
- 130. Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B. & Pantel, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 426–437 (2011).
- 131. Holdenrieder, S. *et al.* Clinical Relevance of Circulating Nucleosomes in Cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1137**, 180–189 (2008).
- 132. Jiang, P. *et al.* The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet.* **32**, 360–371 (2016).
- 133. Jiang, P. *et al.* Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201500076 (2015). doi:10.1073/pnas.1500076112
- 134. Diehl, F. *et al.* Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 16368–16373 (2005).
- 135. Thierry, A. R. *et al.* Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6159–75 (2010).
- 136. Gorges, T. M. *et al.* Cancer therapy monitoring in xenografts by quantitative analysis of circulating tumor DNA. *http://dx.doi.org/10.3109/1354750X.2012.689133* (2012).
- 137. Rago, C. *et al.* Serial assessment of human tumor burdens in mice by the analysis of circulating DNA. *Cancer Res.* **67**, 9364–70 (2007).
- 138. Sato, K. A. *et al.* Individualized Mutation Detection in Circulating Tumor DNA for Monitoring Colorectal Tumor Burden Using a Cancer-Associated Gene Sequencing Panel. *PLoS One* **11**, e0146275 (2016).
- 139. Lipson, E. J. *et al.* Circulating tumor DNA analysis as a real-time method for monitoring tumor burden in melanoma patients undergoing treatment with immune checkpoint blockade. *J. Immunother. cancer* **2**, 42 (2014).
- 140. Roschewski, M. *et al.* Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet. Oncol.* **16**, 541–9 (2015).
- 141. Bettegowda, C. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6**, 224ra24 (2014).

- 142. Dawson, S.-J. *et al.* Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1199–209 (2013).
- 143. Laurent-Puig, P. *et al.* Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin. Cancer Res.* **21**, 1087–97 (2015).
- 144. Murtaza, M. *et al.* Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* **497**, 108–12 (2013).
- 145. Lebofsky, R. *et al.* Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mol. Oncol.* **9**, 783–790 (2015).
- 146. Lecomte, T. *et al.* Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int. J. Cancer* **100**, 542–8 (2002).
- 147. Siravegna, G. *et al.* Genotyping cell-free tumor DNA in the blood to detect residual disease and drug resistance. *Genome Biol.* **15**, 449 (2014).
- 148. Misale, S. *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* **486**, 532–6 (2012).
- 149. Thierry, A. R. *et al.* Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat. Med.* **20**, 430–5 (2014).
- 150. Bettegowda, C. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6**, 224ra24 (2014).
- 151. MANDEL, P. & METAIS, P. [Not Available]. Comptes rendus des séances la Société Biol. ses Fil. 142, 241–3 (1948).
- 152. Chan, K. C. A. *et al.* Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* **50**, 88–92 (2004).
- 153. Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L. & Quake, S. R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 16266–71 (2008).
- 154. Leon, S. A., Ehrlich, G. E., Shapiro, B. & Labbate, V. A. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J. Rheumatol.* **4**, 139–43 (1977).
- 155. van der Vaart, M. & Pretorius, P. J. Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated? *Clin. Biochem.* **43**, 26–36 (2010).
- 156. Shapiro, B., Chakrabarty, M., Cohn, E. M. & Leon, S. A. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* **51**, 2116–2120 (1983).
- 157. Stroun, M. *et al.* Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* **46**, 318–22 (1989).
- 158. Stroun, M. et al. The origin and mechanism of circulating DNA. Ann. N. Y. Acad. Sci. 906, 161–8 (2000).
- 159. Nawroz, H., Koch, W., Anker, P., Stroun, M. & Sidransky, D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat. Med.* **2**, 1035–7 (1996).
- 160. Castells, A. *et al.* K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J. Clin. Oncol.* **17**, 578–84 (1999).
- 161. Theodor, L. *et al.* Detection of pancreatic carcinoma: diagnostic value of K-ras mutations in circulating DNA from serum. *Dig. Dis. Sci.* **44**, 2014–9 (1999).
- 162. Heidary, M. *et al.* The dynamic range of circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* **16**, 421 (2014).
- 163. 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. *Clin. Chim. Acta* **313**, 139–142 (2001).
- 164. Choi, J. J., Reich, C. F. & Pisetsky, D. S. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology* **115**, 55–62 (2005).
- 165. Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Mulcahy, H. E. & 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? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **945**, 258–264 (2001).
- 166. Jahr, S. *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* **61**, 1659–65 (2001).
- 167. Giacona, M. B. *et al.* Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* **17**, 89–97 (1998).
- 168. Mouliere, F. *et al.* High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* **6**, e23418 (2011).
- 169. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 11–22 (2003).

- 170. Diehl, F. *et al.* Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* **135**, 489–498 (2008).
- 171. Wang, W. *et al.* Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5974–5981 (2007).
- 172. Jung, K., Fleischhacker, M. & Rabien, A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—A critical appraisal of the literature. *Clin. Chim. Acta* **411**, 1611–1624 (2010).
- 173. Gray, E. S. *et al.* Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget* **6**, 42008–18 (2015).
- 174. Leary, R. J. *et al.* Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with wholegenome sequencing. *Sci. Transl. Med.* **4**, 162ra154 (2012).
- 175. Chan, K. C. A. *et al.* Cancer Genome Scanning in Plasma: Detection of Tumor-Associated Copy Number Aberrations, Single-Nucleotide Variants, and Tumoral Heterogeneity by Massively Parallel Sequencing. *Clin. Chem.* **59**, 211–224 (2013).
- 176. Leary, R. J. *et al.* Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. *Sci. Transl. Med.* **2**, 20ra14 (2010).
- 177. Salani, R., Chang, C.-L., Cope, L. & Wang, T.-L. Digital karyotyping: an update of its applications in cancer. *Mol. Diagn. Ther.* **10**, 231–7 (2006).
- 178. Gevensleben, H. *et al.* Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. *Clin. Cancer Res.* **19**, 3276–3284 (2013).
- 179. Li, M. *et al.* Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat. Biotechnol.* **27**, 858–63 (2009).
- 180. Weaver, K. D., Grossman, S. A. & Herman, J. G. Methylated Tumor-Specific DNA as a Plasma Biomarker in Patients with Glioma. *http://dx.doi.org/10.1080/07357900500449546* (2009).
- 181. Roperch, J.-P. *et al.* Aberrant methylation of NPY, PENK, and WIF1 as a promising marker for bloodbased diagnosis of colorectal cancer. *BMC Cancer* **13**, 566 (2013).
- 182. Bo, B. L. *et al.* Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 6185–6191 (2009).
- 183. Warton, K. & Samimi, G. Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer. *Front. Mol. Biosci.* **2**, 13 (2015).
- 184. Potter, N. T. *et al.* Validation of a Real-Time PCR-Based Qualitative Assay for the Detection of Methylated SEPT9 DNA in Human Plasma. *Clin. Chem.* **60**, 1183–1191 (2014).
- 185. Molnár, B., Tóth, K., Barták, B. K. & Tulassay, Z. Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker. *http://dx.doi.org/10.1586/14737159.2015.975212* (2015).
- 186.
 Epigenomics
 AG:
 Biomarker
 Septin9.
 at

 <http://www.epigenomics.com/en/technology/biomarker-septin9.html>
- 187. Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2545–50 (1997).
- 188. Silva, J. M. *et al.* Aberrant DNA methylation of the p16INK4a gene in plasma DNA of breast cancer patients. *Br. J. Cancer* **80**, 1262–4 (1999).
- 189. Moulière, F. Etude de la structure et de l'origine des ADN circulants ; application à la mise au point d'un test de détection des mutations KRAS et BRAF dans le cancer colorectal. (2012).
- 190. Umetani, N. *et al.* Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: Direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin. Chem.* **52**, 1062–1069 (2006).
- 191. Umetani, N. *et al.* Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4270–4276 (2006).
- Sunami, E., Vu, A.-T., Nguyen, S. L., Giuliano, A. E. & Hoon, D. S. B. Quantification of LINE1 in Circulating DNA as a Molecular Biomarker of Breast Cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1137**, 171–174 (2008).
 Zerte, E. Nieser, D. & Tele, V. is Advances in Object Observation **79**, 407–240 (2015).
- 193. Zonta, E., Nizard, P. & Taly, V. in Advances in Clinical Chemistry 70, 197–246 (2015).
- 194. Yu, J., Gu, G. & Ju, S. Recent advances in clinical applications of circulating cell-free DNA integrity. *Lab. Med.* **45**, 6–11 (2014).
- 195. Jiang, W.-W. *et al.* Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *Int. J. Cancer* **119**, 2673–2676 (2006).
- 196. Gang, F. *et al.* Prediction of clear cell renal cell carcinoma by integrity of cell-free DNA in serum. *Urology* **75**, 262–5 (2010).
- 197. Madhavan, D. *et al.* Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast Cancer Res. Treat.* **146**, 163–174 (2014).
- 198. Wang, B. G. et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. Cancer Res. 63, 3966–8 (2003).
- 199. Salvianti, F. et al. Multiparametric Analysis of Cell-Free DNA in Melanoma Patients. PLoS One 7, e49843
(2012).

- 200. Mouliere, F., El Messaoudi, S., Pang, D., Dritschilo, A. & Thierry, A. R. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol. Oncol.* **8**, 927–41 (2014).
- 201. Diehl, F. et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. Nat. Med. 14, 985–90 (2008).
- 202. Shinozaki, M. *et al.* Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2068–74 (2007).
- 203. Forshew, T. *et al.* Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA. *Sci. Transl. Med.* **4**, 136ra68-136ra68 (2012).
- 204. Denis, M. G., Vallée, A. & Théoleyre, S. EGFR T790M resistance mutation in non small-cell lung carcinoma. *Clinica Chimica Acta* **444**, 81–85 (2015).
- 205. Taniguchi, K. *et al.* Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* **17**, 7808–7815 (2011).
- 206. Oxnard, G. R. *et al.* Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin. Cancer Res.* **20**, 1698–705 (2014).
- 207. Azuara, D. *et al.* Nanofluidic Digital PCR and Extended Genotyping of RAS and BRAF for Improved Selection of Metastatic Colorectal Cancer Patients for Anti-EGFR Therapies. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 1106–12 (2016).
- 208. Ludwig, J. A. & Weinstein, J. N. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 845–56 (2005).
- 209. Caen, O. *et al.* PCR digitale en micro- compartiments II. Apport pour la détection quantitative d'ADN tumoral circulant. *Sciences (New. York).* **31**, 180–6 (2015).
- 210. Pekin, D. *et al.* Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip* **11**, 2156–66 (2011).
- 211. Lo, Y. M. *et al.* Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 218–24 (1999).
- 212. Yu, S. C. Y. *et al.* High-Resolution Profiling of Fetal DNA Clearance from Maternal Plasma by Massively Parallel Sequencing. *Clin. Chem.* **59**, 1228–1237 (2013).
- 213. El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F. & Thierry, A. R. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin. Chim. Acta.* **424**, 222–230 (2013).
- 214. Vallée, A. *et al.* Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung Cancer* **82**, 373–374 (2013).
- 215. Devonshire, A. S. *et al.* Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 6499–512 (2014).
- 216. Wahlberg, K. *et al.* Quality assessment of biobanked nucleic acid extracts for downstream molecular analysis. *Biopreserv. Biobank.* **10**, 266–75 (2012).
- 217. Taly, V., Pekin, D., El Abed, A. & Laurent-Puig, P. Detecting biomarkers with microdroplet technology. *Trends Mol. Med.* **18**, 405–16 (2012).
- 218. Perez-Toralla, K. *et al.* PCR digitale en micro- compartiments I. Détection sensible de séquences d'acides nucléiques rares. **31**, (2015).
- 219. Diaz, L. A. & Bardelli, A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol.* **32**, 579–86 (2014).
- 220. Sykes, P. J. *et al.* Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques* **13**, 444–449 (1992).
- 221. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Digital PCR. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 9236–41 (1999).
- 222. Hindson, B. J. *et al.* High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal. Chem.* **83**, 8604–8610 (2011).
- 223. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Digital PCR. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 9236–9241 (1999).
- 224. Westra, J. L. *et al.* Determination of TP53 Mutation Is More Relevant Than Microsatellite Instability Status for the Prediction of Disease-Free Survival in Adjuvant-Treated Stage III Colon Cancer Patients. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5635–5643 (2005).
- 225. Baker, D. & Khamsi, R. Straight talk with...David Baker. Nat. Med. 18, 1599 (2012).
- 226. Thorsen, T., Maerkl, S. J. & Quake, S. R. Microfluidic large-scale integration. Science 298, 580–4 (2002).
- 227. Warren, L., Bryder, D., Weissman, I. L. & Quake, S. R. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17807–12 (2006).
- Yung, T. K. F. *et al.* Single-Molecule Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Plasma by Microfluidics Digital PCR in Non–Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2076–2084 (2009).
- 229. Henríquez-Hernández, L. A. et al. High-throughput genotyping system as a robust and useful tool in

oncology: Experience from a single institution. *Biologicals* **41**, 424–429 (2013).

- 230. Fluidigm. Fluidigm Biomark HD. at <https://www.fluidigm.com/products/biomark-hd-system>
- 231. Formulatrix. Constellation Digital PCR. at http://formulatrix.com/pcr/index.html
- 232. Thermofisher scientific. QuantStudio® 3D Digital PCR System. at https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/pcr/digital-pcr/quantstudio-3d-digital-pcr-system.html
- 233. JN Medsys. Clarity Digital PCR Technology. at http://www.jnmedsys.com/digital-pcr-description/
- 234. Shen, F., Du, W., Kreutz, J. E., Fok, A. & Ismagilov, R. F. Digital PCR on a SlipChip. *Lab Chip* **10**, 2666–2672 (2010).
- 235. Baret, J., Taly, V., Ryckelynck, M., Merten, C. A. & Griffiths, A. D. Gouttes et émulsions : Criblage à très haut débit en biologie. *Médecine Sci.* 627–632 (2009).
- 236. Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8817–8822 (2003).
- 237. Turner, E. H., Ng, S. B., Nickerson, D. A. & Shendure, J. Methods for Genomic Partitioning. http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-150112 (2009).
- 238. Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8817–8822 (2003).
- 239. Diehl, F. *et al.* Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. (2005).
- 240. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. Nature 442, 368-73 (2006).
- 241. Baret, J.-C. Surfactants in droplet-based microfluidics. Lab Chip 12, 422–33 (2012).
- 242. Mastrobattista, E. *et al.* High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a betagalactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions. *Chem. Biol.* **12**, 1291–300 (2005).
- Frenz, L., Blank, K., Brouzes, E. & Griffiths, A. D. Reliable microfluidic on-chip incubation of droplets in delay-lines. *Lab Chip* 9, 1344–8 (2009).
- 244. Kiss, M. M. *et al.* High-Throughput Quantitative Polymerase Chain Reaction in Picoliter Droplets. *Anal. Chem.* **80**, 8975–8981 (2008).
- 245. Zhong, Q. *et al.* Multiplex digital PCR: breaking the one target per color barrier of quantitative PCR. *Lab Chip* **11**, 2167 (2011).
- 246. Zonta, E., Garlan, F., Perez-Toralla, K. & Taly, V. Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations.
- 247. Liao, G. J. W., Gronowski, A. M. & Zhao, Z. Non-invasive prenatal testing using cell-free fetal DNA in maternal circulation. *Clin. Chim. Acta.* **428**, 44–50 (2013).
- 248. Perlado, S. *et al.* Fetal Genotyping in Maternal Blood by Digital PCR: Towards NIPD of Monogenic Disorders Independently of Parental Origin. *PLoS One* **11**, e0153258 (2016).
- 249. Giovannelli, I. *et al.* Utility of droplet digital PCR for the quantitative detection of polyomavirus JC in clinical samples. *J. Clin. Virol.* **82**, 70–5 (2016).
- 250. Stilla. Stilla. at <http://www.stilla.fr/>
- 251. Pender, A. *et al.* Efficient Genotyping of KRAS Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Using a Multiplexed Droplet Digital PCR Approach. *PLoS One* **10**, e0139074 (2015).
- 252. Taly, V. *et al.* Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect KRAS Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. *Clin. Chem.* (2013). doi:10.1373/clinchem.2013.206359
- 253. McDermott, G. P. *et al.* Multiplexed target detection using DNA-binding dye chemistry in droplet digital PCR. *Anal. Chem.* (2013). at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24180464>
- 254. Miotke, L., Lau, B. T., Rumma, R. T. & Ji, H. P. High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. *Anal. Chem.* **86**, 2618–24 (2014).
- 255. Li, J. *et al.* Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat. Med.* **14**, 579–84 (2008).
- 256. Castellanos-Rizaldos, E. *et al.* Temperature-tolerant COLD-PCR reduces temperature stringency and enables robust mutation enrichment. *Clin. Chem.* **58**, 1130–8 (2012).
- 257. Castellanos-Rizaldos, E. *et al.* Enhanced ratio of signals enables digital mutation scanning for rare allele detection. *J. Mol. Diagnostics* **17**, 284–292 (2015).
- 258. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622 (2009).
- 259. Milbury, C. A. et al. Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene

mutations. Biomol. Detect. Quantif. 1, 8–22 (2014).

- 260. Huggett, J. F., Cowen, S. & Foy, C. A. Considerations for Digital PCR as an Accurate Molecular Diagnostic Tool. *Clin. Chem.* **61**, 79–88 (2015).
- 261. Hudecova, I. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clin. Biochem.* 48, 948–956 (2015).
- 262. Sedlak, R. H., Kuypers, J. & Jerome, K. R. A multiplexed droplet digital PCR assay performs better than qPCR on inhibition prone samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **80**, 285–6 (2014).
- 263. Dingle, T. C., Sedlak, R. H., Cook, L. & Jerome, K. R. Tolerance of Droplet-Digital PCR vs Real-Time Quantitative PCR to Inhibitory Substances. *Clin. Chem.* (2013). doi:10.1373/clinchem.2013.211045
- 264. Beaver, J. A. *et al.* Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2643–50 (2014).
- 265. Sanmamed, M. F. *et al.* Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin. Chem.* **61**, 297–304 (2015).
- 266. Olsson, E. *et al.* Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Mol. Med.* **7**, 1034–47 (2015).
- 267. Reinert, T. *et al.* Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut* **65**, 625–634 (2016).
- 268. Long, G. V et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. J. Clin. Oncol. 29, 1239–46 (2011).
- 269. Davies, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 417, 949–954 (2002).
- 270. Patel, K. M. & Tsui, D. W. Y. The translational potential of circulating tumour DNA in oncology. *Clin. Biochem.* **48**, 957–961 (2015).
- 271. Su, Y.-H. *et al.* Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J. Mol. Diagn.* **6**, 101–7 (2004).
- 272. Birkenkamp-Demtröder, K. *et al.* Genomic Alterations in Liquid Biopsies from Patients with Bladder Cancer. *Eur. Urol.* **70**, 75–82 (2016).
- 273. Hervier, B. *et al.* Association of both Langerhans cell histiocytosis and Erdheim-Chester disease linked to the BRAFV600E mutation. *Blood* **124**, 1119–26 (2014).
- 274. Janku, F. *et al.* BRAF V600E mutations in urine and plasma cell-free DNA from patients with Erdheim-Chester disease. *Oncotarget* **5**, 3607–10 (2014).
- 275. Hyman, D. M. *et al.* Prospective Blinded Study of BRAFV600E Mutation Detection in Cell-Free DNA of Patients with Systemic Histiocytic Disorders. *Cancer Discov.* **5**, 64–71 (2015).
- 276. Hack, S. P., Bruey, J.-M. & Koeppen, H. HGF/MET-directed therapeutics in gastroesophageal cancer: a review of clinical and biomarker development. *Oncotarget* **5**, 2866–80 (2014).
- 277. Kwak, E. L. *et al.* Molecular Heterogeneity and Receptor Coamplification Drive Resistance to Targeted Therapy in MET-Amplified Esophagogastric Cancer. *Cancer Discov.* **5**, 1271–81 (2015).
- 278. Shoda, K. *et al.* Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 1–10 (2016). doi:10.1007/s10120-016-0599-z
- 279. Barault, L. *et al.* Digital PCR quantification of *MGMT* methylation refines prediction of clinical benefit from alkylating agents in glioblastoma and metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* **26**, 1994–1999 (2015).
- Eads, C. A. *et al.* MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 28, E32 (2000).
- 281. Garrigou, S. *et al.* A Study of Hypermethylated Circulating Tumor DNA as a Universal Colorectal Cancer Biomarker. *Clin. Chem.* (2016). doi:10.1373/clinchem.2015.253609
- 282. Umetani, N. *et al.* Increased Integrity of Free Circulating DNA in Sera of Patients with Colorectal or Periampullary Cancer: Direct Quantitative PCR for ALU Repeats. *Clin. Chem.* **52**, 1062–1069 (2006).
- 283. Pekin, D. *et al.* Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip* **11**, 2156–2166 (2011).
- 284. Newman, A. M. *et al.* An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat. Med.* **20**, 548–54 (2014).
- 285. Vaca-Paniagua, F. *et al.* Targeted deep DNA methylation analysis of circulating cell-free DNA in plasma using massively parallel semiconductor sequencing. *Epigenomics* **7**, 353–62 (2015).
- 286. Sun, K. *et al.* Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E5503-12 (2015).
- 287. Kukita, Y. *et al.* High-fidelity target sequencing of individual molecules identified using barcode sequences: de novo detection and absolute quantitation of mutations in plasma cell-free DNA from cancer patients. *DNA Res.* **22**, 269–77 (2015).
- 288. Didelot, A. et al. Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in

clinical samples. Clin. Chem. 59, 815–23 (2013).

- Aigrain, L., Gu, Y. & Quail, M. A. Quantitation of next generation sequencing library preparation protocol efficiencies using droplet digital PCR assays - a systematic comparison of DNA library preparation kits for Illumina sequencing. *BMC Genomics* 17, 458 (2016).
- 290. Tone, A. A. *et al.* Intratumoral heterogeneity in a minority of ovarian low-grade serous carcinomas. *BMC Cancer* **14**, 982 (2014).
- 291. Pécuchet, N. *et al.* Analysis of Base-Position Error Rate of Next-Generation Sequencing to Detect Tumor Mutations in Circulating DNA. *Clin. Chem.* clinchem.2016.258236 (2016). doi:10.1373/clinchem.2016.258236
- 292. Kinde, I., Wu, J., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9530–5 (2011).
- 293. Tewhey, R. *et al.* Microdroplet-based PCR enrichment for large-scale targeted sequencing. *Nat. Biotechnol.* **27**, 1025–31 (2009).
- 294. Tung, N. *et al.* Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for *BRCA 1* and *BRCA 2* testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer* **121**, 25–33 (2015).
- 295. Holbrook, J. D. *et al.* Deep sequencing of gastric carcinoma reveals somatic mutations relevant to personalized medicine. *J. Transl. Med.* **9**, 119 (2011).
- 296. Paul, D. S. *et al.* Assessment of RainDrop BS-seq as a method for large-scale, targeted bisulfite sequencing. *Epigenetics* **9**, 678–84 (2014).
- 297. Izumchenko, E. *et al.* Targeted sequencing reveals clonal genetic changes in the progression of early lung neoplasms and paired circulating DNA. *Nat. Commun.* **6**, 8258 (2015).
- 298. Alakus, H. *et al.* Genome-wide mutational landscape of mucinous carcinomatosis peritonei of appendiceal origin. *Genome Med.* **6**, 43 (2014).
- 299. Pereira, E. *et al.* Personalized Circulating Tumor DNA Biomarkers Dynamically Predict Treatment Response and Survival In Gynecologic Cancers. *PLoS One* **10**, e0145754 (2015).
- 300. WHO. World Health Organization GLOBOCAN 2012. (2012). at http://globocan.iarc.fr/
- 301. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359-86 (2014).
- 302. Pasetto, L. M. Preoperative versus postoperative treatment for locally advanced rectal carcinoma. *Futur. Oncol.* **1**, 209–220 (2005).
- 303. cancer.org. cancer.org. at http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer
- 304. Laurenty, A. P., Bouyoucef, K., Selves, J. & Guimbaud, R. Biomarqueurs des cancers colorectaux utiles en pratique clinique. *Hepato-Gastro* 22, 217–227 (2015).
- 305. Majithia, N. & Grothey, A. Regorafenib in the treatment of colorectal cancer. http://dx.doi.org/10.1517/14656566.2016.1118054 (2015).
- 306. Grothey, A. *et al.* Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)* **381**, 303–12 (2013).
- 307. Lièvre, A. & Laurent-Puig, P. Genetics: Predictive value of KRAS mutations in chemoresistant CRC. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **6**, 306–7 (2009).
- 308. Taly, V. *et al.* Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect KRAS Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. *Clin. Chem.* **59**, 1722–1731 (2013).
- 309. Huggett, J. F. *et al.* Guidelines for minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clin. Chem.* **59**, 892–902 (2013).
- 310. Wang, J. *et al.* Quantifying EGFR Alterations in the Lung Cancer Genome with Nanofluidic Digital PCR Arrays. *Clin. Chem.* **56**, 623–632 (2010).
- 311. Zhang, B. O. *et al.* Comparison of droplet digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring EGFR gene mutation. *Exp. Ther. Med.* **9**, 1383–1388 (2015).
- 312. Uchiyama, Y. *et al.* Ultra-sensitive droplet digital PCR for detecting a low-prevalence somatic GNAQ mutation in Sturge-Weber syndrome. *Sci. Rep.* **6**, 22985 (2016).
- 313. IDT & RainDance Technologies. Digital PCR—Simplifying quantitative PCR. at
- 314. Holdenrieder, S., Burges, A., Reich, O., Spelsberg, F. W. & Stieber, P. DNA Integrity in Plasma and Serum of Patients with Malignant and Benign Diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1137**, 162–170 (2008).
- 315. YORUKER, E. E. *et al.* Assessment of Circulating Serum DNA Integrity in Colorectal Cancer Patients. *Anticancer Res* **35**, 2435–2440 (2015).

- 316. Jahr, S. *et al.* DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients : Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients : Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necr. *Cancer Res.* **61**, 1659–1665 (2001).
- 317. Choi, J. J., Reich, C. F. & Pisetsky, D. S. Release of DNA from dead and dying lymphocyte and monocyte cell lines in vitro. *Scand. J. Immunol.* **60**, 159–166 (2004).
- 318. Mouliere, F. *et al.* Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Transl. Oncol.* **6**, 319–28 (2013).
- 319. Underhill, H. R. et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. PLOS Genet. 12, e1006162 (2016).
- 320. Soldani, C. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and where? *Exp. Cell Res.* **269**, 193–201 (2001).
- 321. PerkinElmer. Microfluidic Instruments, Caliper LabChip. at http://www.perkinelmer.com/category/microfluidic-instruments
- 322. Ranchon, H. *et al.* DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids. *Lab Chip* **16**, 1243–53 (2016).
- 323. Devonshire, A. S. *et al.* Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 6499–512 (2014).
- 324. Yu, S. C. Y. *et al.* Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8583–8 (2014).
- 325. Tsui, N. B. Y. *et al.* High resolution size analysis of fetal DNA in the urine of pregnant women by pairedend massively parallel sequencing. *PLoS One* **7**, e48319 (2012).
- 326. Serafino, A. *et al.* WNT-pathway components as predictive markers useful for diagnosis, prevention and therapy in inflammatory bowel disease and sporadic colorectal cancer. *Oncotarget* **5**, 978–92 (2014).
- 327. Novellasdemunt, L. *et al.* Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **309**, C511-21 (2015).
- 328. Masuda, M., Sawa, M. & Yamada, T. Therapeutic targets in the Wnt signaling pathway: Feasibility of targeting TNIK in colorectal cancer. *Pharmacol. Ther.* **156**, 1–9 (2015).
- 329. Ashour, N. *et al.* A DNA hypermethylation profile reveals new potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis. *Prostate* **74**, 1171–82 (2014).
- 330. Lee, E.-J. *et al.* Identification of Global DNA Methylation Signatures in Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells. *J. Genet. Genomics* **42**, 355–71 (2015).
- 331. Salhia, B. *et al.* Integrated genomic and epigenomic analysis of breast cancer brain metastasis. *PLoS One* **9**, e85448 (2014).
- 332. Kao, W.-Y. *et al.* Genome-wide identification of blood DNA methylation patterns associated with earlyonset hepatocellular carcinoma development in hepatitis B carriers. *Mol. Carcinog.* (2016). doi:10.1002/mc.22505
- 333. Margolin, G. *et al.* Robust Detection of DNA Hypermethylation of ZNF154 as a Pan-Cancer Locus with in Silico Modeling for Blood-Based Diagnostic Development. *J. Mol. Diagnostics* **18**, 283–298 (2016).
- 334. Yang, X., Gao, L. & Zhang, S. Comparative pan-cancer DNA methylation analysis reveals cancer common and specific patterns. *Brief. Bioinform.* (2016). doi:10.1093/bib/bbw063
- 335. Pan, S.-Y. *et al.* [Methylation quantification of adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter in plasma of lung cancer patients]. *Ai Zheng* **28**, 384–9 (2009).
- 336. Qi, Q. *et al.* Circulating DNA for detection of gastric cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **20**, 2558–64 (2016).
- 337. Kristiansen, S., Nielsen, D. & Sölétormos, G. Detection and monitoring of hypermethylated RASSF1A in serum from patients with metastatic breast cancer. *Clin. Epigenetics* **8**, 35 (2016).
- 338. Pimson, C. *et al.* Aberrant methylation of PCDH10 and RASSF1A genes in blood samples for noninvasive diagnosis and prognostic assessment of gastric cancer. *PeerJ* **4**, e2112 (2016).
- 339. Perkins, G., Pilati, C., Blons, H. & Laurent-Puig, P. Beyond KRAS status and response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics* **15**, 1043–1052 (2014).
- 340. INCA. e-cancer. at <www.e-cancer.fr>
- 341. Balch, C. M. *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* 27, 6199–206 (2009).
- 342. Buzaid, A. C. Management of metastatic cutaneous melanoma. *Oncology (Williston Park).* **18**, 1443-50–9 (2004).
- 343. Danson, S. & Lorigan, P. Improving outcomes in advanced malignant melanoma: update on systemic therapy. *Drugs* **65**, 733–43 (2005).
- 344. Bhatia, S., Tykodi, S. S. & Thompson, J. A. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology* (*Williston Park*). 23, 488–96 (2009).

- 345. Atefi, M. *et al.* Combination of pan-RAF and MEK inhibitors in NRAS mutant melanoma. *Mol. Cancer* **14**, 27 (2015).
- 346. Kramkimel, N. *et al.* Vemurafenib pharmacokinetics and its correlation with efficacy and safety in outpatients with advanced BRAF-mutated melanoma. *Target. Oncol.* **11**, 59–69 (2016).
- 347. HILL, B. R. & LEVI, C. Elevation of a serum component in neoplastic disease. *Cancer Res.* 14, 513–5 (1954).
- 348. Eton, O. *et al.* Prognostic factors for survival of patients treated systemically for disseminated melanoma. *J. Clin. Oncol.* **16**, 1103–11 (1998).
- 349. Balch, C. M. *et al.* Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* **19**, 3635–48 (2001).
- 350. Egberts, F., Momkvist, A., Egberts, J.-H., Kaehler, K. C. & Hauschild, A. Serum S100B and LDH are not useful in predicting the sentinel node status in melanoma patients. *Anticancer Res.* **30**, 1799–805 (2010).
- 351. Schreuer, M. *et al.* Quantitative assessment of BRAF V600 mutant cell-free tumor DNA from plasma as a diagnostic and therapeutic biomarker in pts with BRAF V600 mutant melanoma. *ASCO Meet. Abstr.* **33**, 9015 (2015).
- 352. Schreuer, M. *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. *J. Transl. Med.* **14**, 95 (2016).
- 353. Lipson, E. J. *et al.* Circulating tumor DNA analysis as a real-time method for monitoring tumor burden in melanoma patients undergoing treatment with immune checkpoint blockade. *J. Immunother. cancer* **2**, 42 (2014).
- 354. Garrigou, S. *et al.* A Study of Hypermethylated Circulating Tumor DNA as a Universal Colorectal Cancer Biomarker. *Clin. Chem.* (2016).
- 355. Almufti, R. *et al.* A critical review of the analytical approaches for circulating tumor biomarker kinetics during treatment. *Ann. Oncol.* **25**, 41–56 (2014).
- 356. Mandrekar, J. N. Statistics and Data Analysis Cutpoint Determination Methods in Survival Analysis using SAS ® Mandrekar J . N ., Section of Biostatistics , Mayo Clinic , Rochester , MN Mandrekar S . J ., The Ohio State University , Columbus , OH Cha S . S ., Section of Bi. 1–5
- 357. A, C. Dynamic changes in circulating tumor cell levels as a prognostic marker in stage IV non-small cell lung cancer. *2013 ASCO Annu. Meet.* at http://meetinglibrary.asco.org/content/117512-132
- 358. Tie, J. *et al.* Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* **26**, 1715–22 (2015).
- 359. Buller, R. E., Vasilev, S. & DiSaia, P. J. CA 125 kinetics: a cost-effective clinical tool to evaluate clinical trial outcomes in the 1990s. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **174**, 1241-53–4 (1996).
- Buller, R. E., Berman, M. L., Bloss, J. D., Manetta, A. & DiSaia, P. J. Serum CA125 regression in epithelial ovarian cancer: correlation with reassessment findings and survival. *Gynecol. Oncol.* 47, 87–92 (1992).
- Kim, H. S. *et al.* Clinical significance of a serum CA15-3 surge and the usefulness of CA15-3 kinetics in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **118**, 89–97 (2009).