

Biopsie liquide et SNG : propulser la recherche au niveau supérieur

L'ADN acellulaire est susceptible de déchiffrer l'hétérogénéité tumorale.

Introduction

L'ADN acellulaire (ADNa) circulant dans le sang peut provenir de différents tissus, de différentes tumeurs ou d'autres micro-organismes présents dans le corps. L'analyse d'une biopsie liquide d'ADNa présent dans le sang est particulièrement utile dans l'évaluation et la surveillance de certaines maladies, y compris le cancer.

Les tumeurs peuvent se départir d'une quantité importante d'ADN. L'ADN libéré d'une cellule tumorale morte, qu'on appelle ADN de tumeurs circulantes (ADNtc), représente une petite partie de l'ADNa qu'on retrouve dans le sang. Par conséquent, un test fiable est nécessaire pour détecter les mutations somatiques de basse fréquence.

Les méthodes de séquençage nouvelle génération (SNG) permettent une détection spécifique et très sensible des mutations connues. Dans les dernières années, des tests complets ont été mis au point pour analyser un plus vaste éventail de gènes candidats et de types de variants pour de nouvelles tumeurs pour lesquelles les variants n'étaient pas connus. Au fur et à mesure que ces méthodes évoluent, l'analyse de l'ADNa pour différentes applications comme le dépistage, le choix du traitement, la surveillance et la détection d'une résistance au traitement gagne en importance comme méthode de surveillance de l'évolution de la maladie.

Avantages de la biopsie liquide par rapport à la biopsie de tissus

En tant que méthode relativement non effractive pour la collecte d'échantillons, les biopsies liquides sont particulièrement utiles lorsque le tissu d'intérêt est inaccessible. Même lorsque le tissu malade peut être prélevé, une nouvelle biopsie de surveillance est souhaitable dans plusieurs maladies pour lesquelles l'analyse de l'ADNa présente plusieurs avantages.

La collecte d'échantillons de biopsie liquide peut être effectuée par le biais de méthodes de phlébotomie courantes pour lesquelles un grand nombre de professionnels qualifiés sont disponibles. La biopsie de tissus, pour sa part, nécessite souvent des compétences spécialisées et doit être réalisée par des techniciens ou des chirurgiens qualifiés. Pour cette étape essentielle, une biopsie liquide est plus rentable, présente un temps de traitement plus court et comporte moins de risques d'événements indésirables associés. Une fois l'échantillon prélevé, les méthodes d'extraction de l'ADN pour l'analyse de l'ADNa sont plus rapides et moins dispendieuses que de traiter

des échantillons fixés au formol et imprégnés à la paraffine (FFPE). L'accès à certains tissus en particulier peut grandement limiter la réalisation de biopsies de tissus pour une première analyse ou la répétition des biopsies. Les lignes directrices du National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ont été révisées et recommandent la biopsie liquide pour certains types de tumeurs, en particulier dans les cas où la biopsie tumorale n'est pas une option, comme dans le cancer du poumon non à petites cellules.¹

Bien que l'ADNtc provenant de sources spécifiques de tissus représente seulement une petite partie de l'ADNa total, l'analyse de l'ADNa a été améliorée pour devenir un outil d'évaluation de l'hétérogénéité tumorale et surmonter les biais d'échantillonnage des tissus. L'analyse de l'ADNtc peut être utilisée pour surveiller l'évolution de la maladie et la réponse au traitement. Avec les méthodes de séquençage permettant de détecter de nouvelles mutations, la biopsie liquide peut être particulièrement utile dans la surveillance d'une résistance acquise découlant de nouvelles modifications à l'ADN. Avec l'amélioration de la sensibilité et la mise au point de tests permettant d'analyser plusieurs gènes simultanément, l'ADNa peut être utilisé pour le profilage complet des tumeurs (Figure 1). La biopsie liquide peut donc permettre de détecter de nouvelles mutations pendant l'évolution de la maladie et des mutations provenant de nouveaux tissus se trouvant à l'extérieur de la source tumorale originale.

Technologies utilisées dans l'analyse de l'ADNtc

Les méthodes moléculaires les plus couramment utilisées dans l'analyse de l'ADNa sont la PCR quantitative (PCRq), la PCR numérique à gouttelettes (PCRng) et le SNG. Les deux méthodes par PCR nécessitent l'utilisation de sondes à ADN spécifiques pour cibler certains gènes en particulier et fournir une mesure quantitative du nombre de cibles dans l'échantillon. Le SPG nécessite l'utilisation de sondes permettant de capturer des fragments d'ADN spécifiques, mais les données sont fournies sous forme de séquences d'ADN capturé.

PCRq : la PCRq est efficace dans l'analyse d'un petit nombre de variants. Cependant, les tests par PCRq sont limités par le nombre relativement limité de cibles qui sont précisées et permettent seulement d'évaluer certains types de variants, offrant ainsi une valeur limitée en termes de découverte de nouvelles cibles et de nouveaux variants.

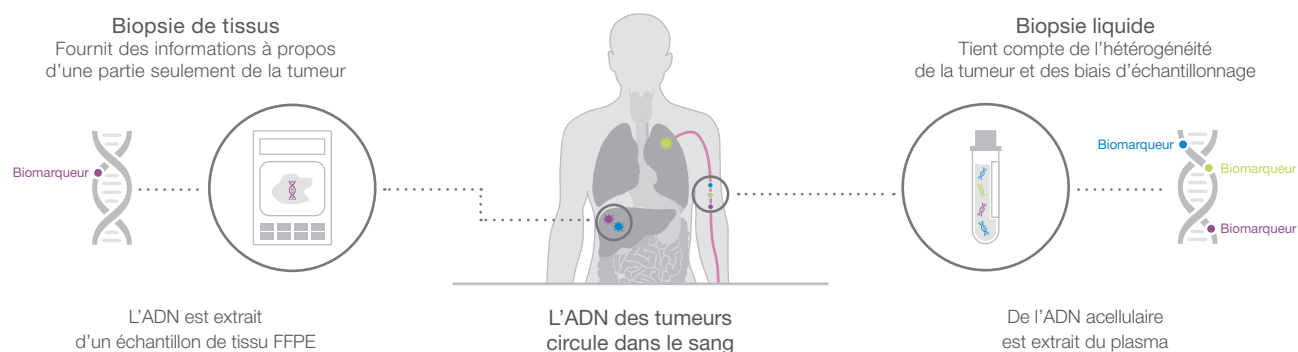


Figure 1 : De nouvelles méthodes moléculaires permettent d'évaluer de nombreux tissus et biomarqueurs à partir d'échantillons de plasma. Le profilage génomique complet à l'aide de l'ADNa regroupe des centaines de marqueurs en un seul essai.

Tableau 1 : Comparaison entre la PCR et le SNG ciblé

Méthode	Avantages	Défis
PCR	Sensibilité élevée Flux de travail habituel Équipement essentiel déjà disponible dans la majorité des laboratoires	Peut seulement permettre d'interroger un ensemble limité de variants à faible résolution Pratiquement aucune capacité de découverte de variants Faible évolutivité en raison d'exigences d'intrants accrues
SNG ciblé	Profondeur de séquençage plus élevée qui permet d'obtenir une plus grande sensibilité (jusqu'à 5 %) Puissance de découverte plus élevée, idéale pour traiter l'hétérogénéité tumorale Résolution plus élevée des variants Débit plus élevé de traitement des échantillons avec multiplexage des échantillons	Pas aussi rentable pour le séquençage d'un nombre moins élevé de cibles (< 20) Pas aussi rapide pour le séquençage d'un nombre moins élevé de cibles (< 20)

PCRng : la PCRng est supérieure à la PCRq en termes de précision, même si elle est plus coûteuse et nécessite une expertise technique supplémentaire. La PCRng offre aussi une valeur limitée en termes de découverte puisque le nombre de cibles et de types de variants est limité par la conception de ce test en particulier.

SNG : puisque le SNG nécessite la résolution mono-nucléotidique des séquences d'ADN, la capacité à découvrir de nouveaux variants existe sans connaissance préalable, y compris dans la conception du test. Ceci permet l'évaluation de nombreux types de variants et la découverte de mutations dans une nouvelle région d'un gène. Le SNG est plus dispendieux et prend plus de temps pour l'analyse d'un petit nombre de variants ou d'échantillons. Mais, lorsque les tests sont conçus pour détecter plus de cibles moléculaires, la nature complète du SNG peut avoir une valeur ajoutée en matière d'efficacité et de rentabilité (tableau 1).

Avantages du SNG pour la biopsie liquide

Le SNG permet le séquençage de millions de fragments d'ADN de façon simultanée, suivi d'un alignement informatique des lectures sur le génome. Selon la conception du test, le SNG peut être très complet et permettre la détection d'un grand nombre de cibles géniques et de types de variants. Alors que le nombre de biomarqueurs activables dans les traitements contre le cancer continue de croître, la capacité à consolider un grand nombre de biomarqueurs en un seul test deviendra plus utile à la fois pour la recherche et les milieux cliniques en permettant de diminuer le nombre de tests nécessaires pour trouver des réponses significatives. Le SNG pourrait permettre d'épargner des échantillons, du temps et de l'argent en évitant les analyses itératives.

Les options de préparation de la bibliothèque de séquençage, comme la chimie de captation-hybridation, permettent l'extraction de gros fragments de gènes ciblés provenant d'échantillons d'ADNa. Les sondes d'hybridation peuvent être conçues suffisamment grandes pour capturer des cibles même lorsque des mutations existent dans les régions d'hybridation. Le séquençage subséquent des cibles capturées permet la découverte de nouvelles mutations qu'il n'était pas nécessaire de connaître lors de la mise au point du test. Les tests SNG peuvent être conçus pour un grand nombre de gènes avec une faible profondeur de séquençage (plus complets, moins sensibles) ou un nombre relativement petit de gènes avec une profondeur de séquençage plus élevée (moins complets, plus sensibles). En ce qui concerne la biopsie liquide, dans laquelle la fraction d'ADNtc dans un échantillon d'ADNa est potentiellement faible, une profondeur de séquençage élevée est nécessaire pour obtenir la sensibilité nécessaire à la détection de variants peu abondants avec précision. Par conséquent, bien que des panels de gènes de SNG ayant un contenu complet existent, leur application à la biopsie liquide était limitée jusqu'à tout récemment en raison des problèmes de sensibilité.

Le SNG permet le profilage génomique complet.

Les améliorations récentes dans les instruments de séquençage permettent le séquençage des échantillons à une profondeur très élevée de détection pour de grandes parties de génome dans un seul échantillon. Combinant

une grande valeur globale à une sensibilité et une spécificité élevées, le SNG permet l'analyse de centaines de gènes avec la profondeur de séquençage nécessaire à l'analyse de l'ADNa. Ces caractéristiques permettent l'évaluation d'un grand nombre de mutations connues et la découverte de nouvelles mutations pilotes dans la recherche sur le cancer. Pour une précision améliorée, de nouveaux outils moléculaires et de nouvelles méthodes de bioinformatique sont disponibles. Des identifiants moléculaires uniques (IMU) peuvent être intégrés aux préparations de la bibliothèque d'ADN pour marquer les molécules d'ADN avant les étapes d'amplification, puis utilisés par la suite, pendant l'analyse des données, pour détecter les erreurs introduites par la PCR. Des algorithmes sophistiqués permettent de détecter les artefacts de séquençage et de diminuer les erreurs causées par le bruit de fond, ce qui favorise la détection de vrais variants ayant un degré élevé de spécificité.

La biopsie liquide combinée à des tests moléculaires complets pour évaluer des variants somatiques permet la détection de nouvelles mutations provenant de l'évolution tumorale, de la résistance aux médicaments et de métastases. Le cancer est une maladie imprévisible dans laquelle les gènes pilotes ne sont pas toujours connus ou correctement estimés par le type de tissu. Ayant la capacité simultanée d'évaluer plusieurs gènes et plusieurs tissus, la synergie de la biopsie liquide et du profilage génomique facilitée par le SNG comporte une grande valeur. De récentes études portant sur la biopsie liquide jumelée à une biopsie de tissus correspondants provenant d'échantillons tumoraux ont démontré que, lorsque des tests complets sont utilisés, l'analyse de l'ADNa permettait de détecter un nombre important de biomarqueurs et de modifications à l'ADN liés à la résistance au traitement qui n'avaient pas été découverts dans les biopsies de tissus correspondants^{2,3}.

Résumé

Un nombre accru de biomarqueurs, dans l'ère de la médecine de précision, suscitent de plus en plus d'intérêt pour les méthodes moléculaires qui peuvent consolider plusieurs biomarqueurs en un seul test. D'un autre côté, des études ont démontré que la biopsie liquide, dans une perspective plus large d'évolution tumorale systémique, peut permettre d'obtenir des renseignements précieux pour certains types de tumeurs qui peuvent être manqués par la biopsie tissulaire localisée. Avec les progrès récents dans la technologie du SNG, ces deux objectifs peuvent être atteints en permettant un profilage génomique complet combiné avec la sensibilité et la spécificité nécessaires pour les applications de biopsie liquide.

Références

- NCCN Guidelines. www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx. Consulté le 13 décembre 2018.
- Parikh A. R., Leshchiner I., Elagina L. et coll. *Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers*. *Nat Med*. 2019; 25 (9) : 1415-1421.
- Leighl N. B., Page R. D., Raymond V. M. et coll. *Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer*. *Clin Cancer Res*. 2019; 25 (15) : 4691-4700.