

Biopsies liquides et cancers hématologiques : enjeux et perspectives au laboratoire d'hémato-oncologie moléculaire du LHUB

CORATA Belgique
12^{ème} Congrès de Biologie Clinique

Marco FANGAZIO, MD, PhD

Plan de la présentation



Contexte et justification scientifique

- Pourquoi la biopsie liquide dans les cancers hématologiques ?



Mise au point

- Comparaison des kits d'extraction / Développement d'un test ddPCR



Méthodologie

- Collecte des échantillons, design expérimental, « spiking », ddPCR



Résultats principaux

- Extraction d'ADNcf, performance analytique, preuve de concept



Discussion

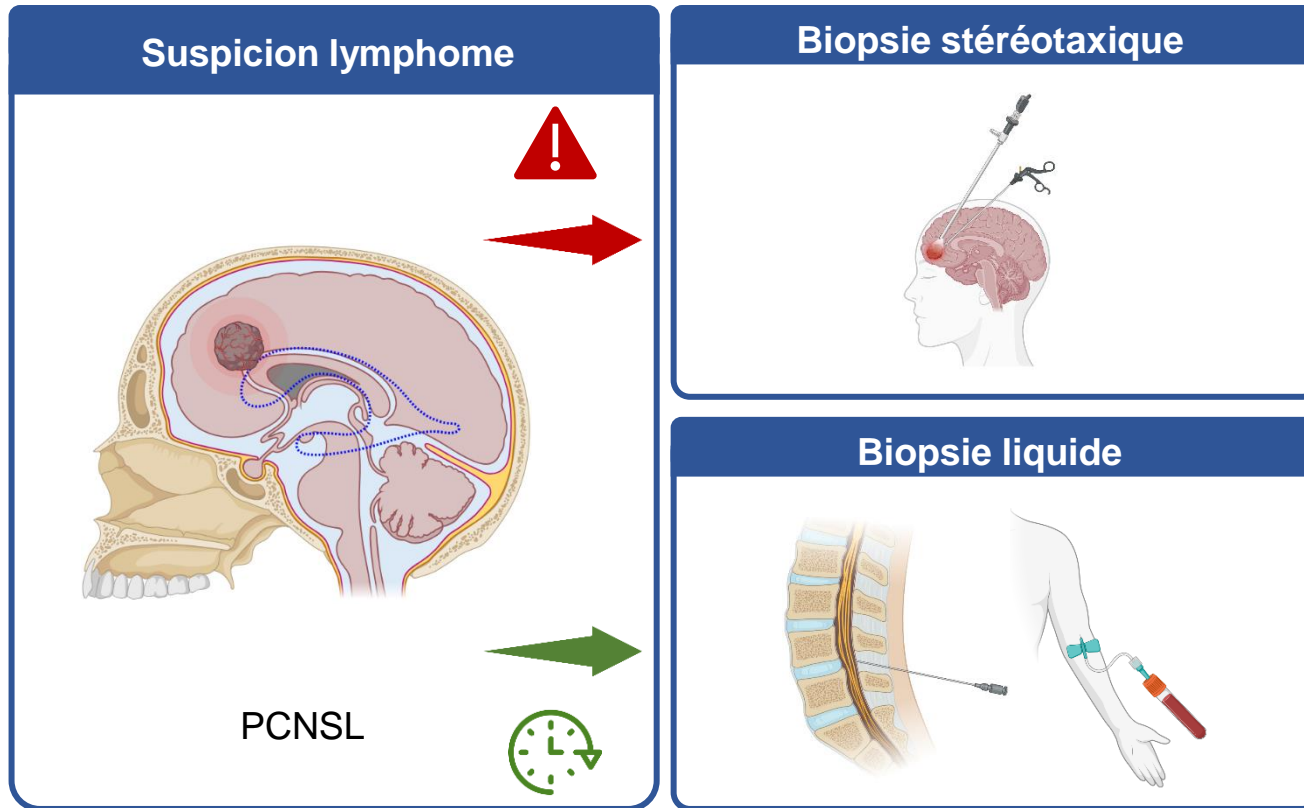
- Interprétation, implications cliniques, limites



Conclusions et perspectives

- Intégration potentielle en clinique, développement futur

Lymphomes agressifs et défis diagnostiques



- Les biopsies tissulaires sont invasives, parfois irréalisables.
- Besoin croissant de méthodes **non invasives, sensibles et dynamiques**.

*Deckert M et al., Hematol Oncol. 2014;
Calimeri T et al., Lancet Haematol. 2024;
Yamagishi Y et al., Cancer Sci. 2021.*



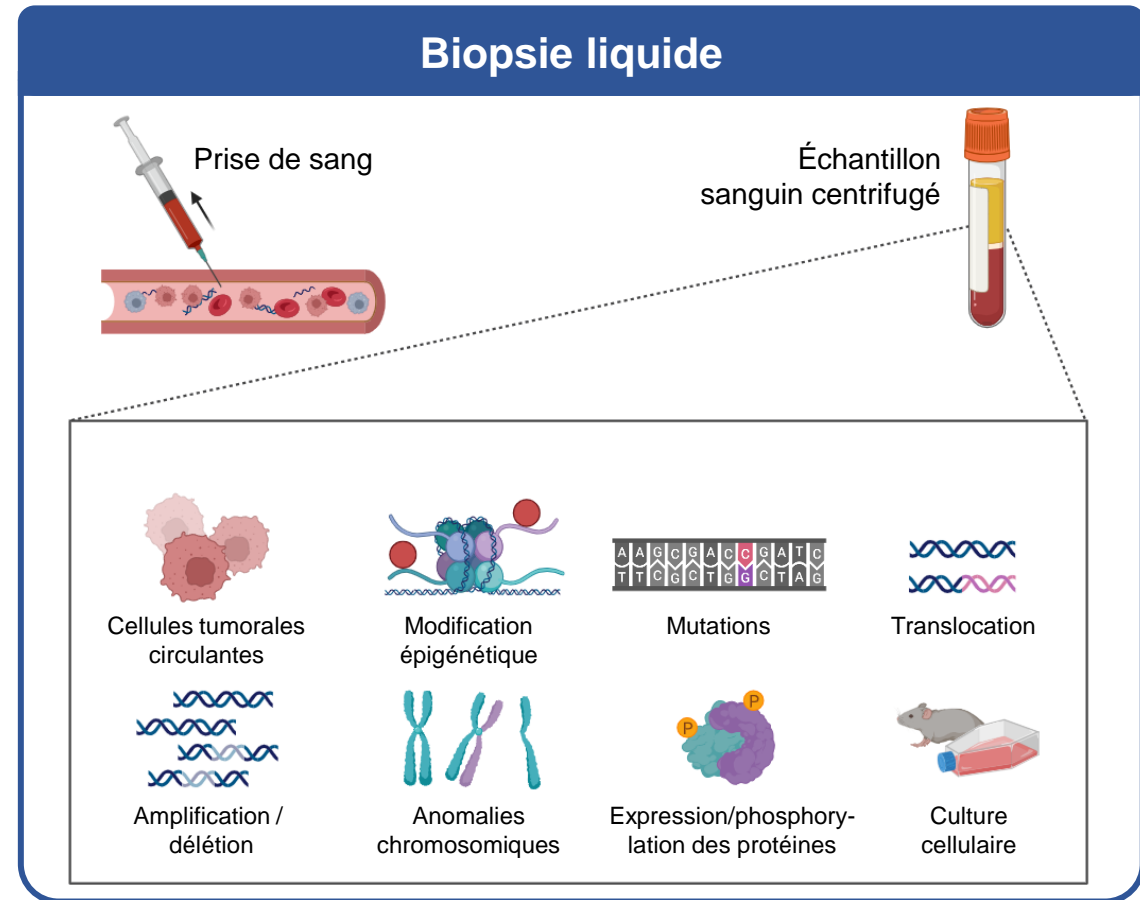
Contexte et justification scientifique



La biopsie liquide

- Permet, entre autre, d'analyser l'ADN libre circulant (ADNcf) dans le sang ou autres liquides corporels.
- Peut donner une vision en temps réel de l'évolution clonale tumorale.
- Applications dans les lymphomes B
 - Pronostic : charge tumorale et agressivité
 - Maladie résiduelle minimale (MRD)
 - Évolution clonale : hétérogénéité et sous-clones

Pantel K, Nat Rev Clin Oncol. 2019;
Roschewski M, Lancet Oncol. 2015;
Kurtz DM, J Clin Oncol. 2018

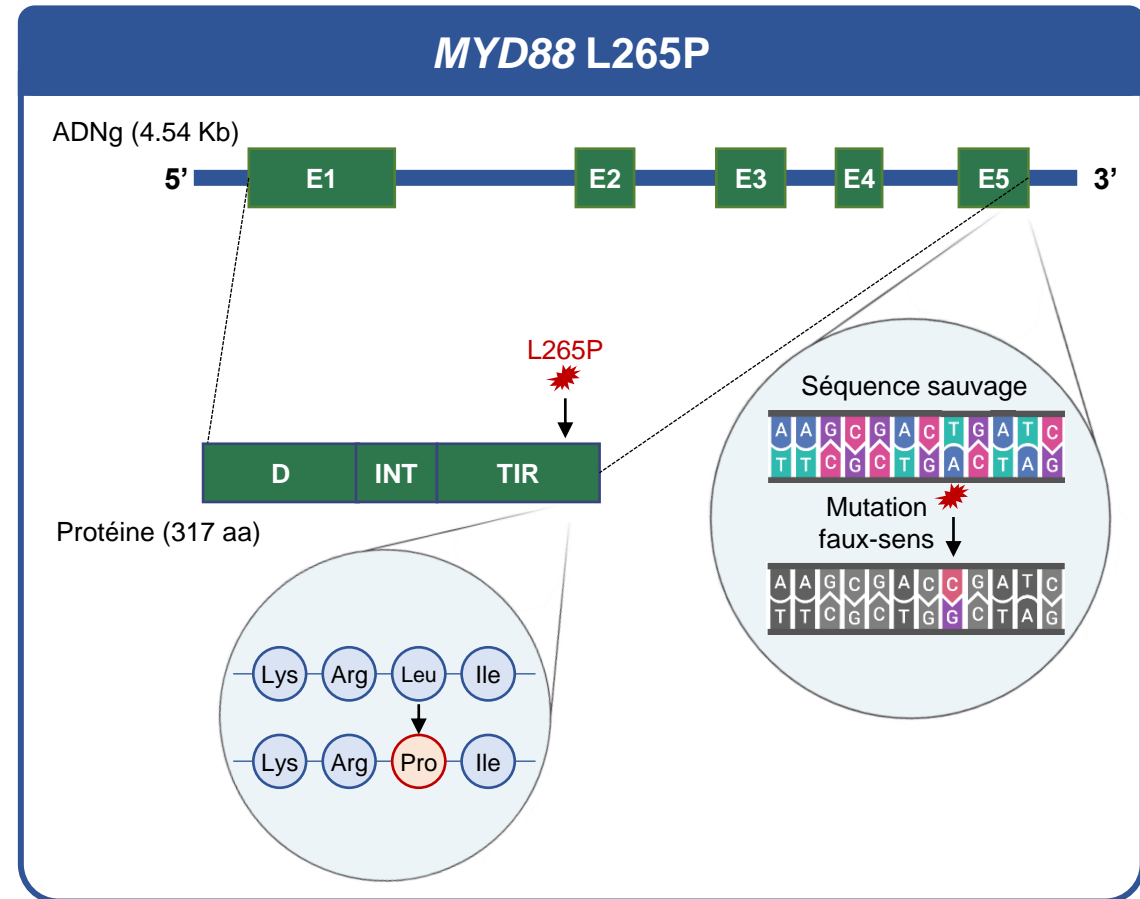


Contexte et justification scientifique



MYD88 L265P comme biomarqueur

- Mutation présente dans :
 - 90% des PCNSL
 - 90% des MW
- Rôle diagnostique et potentiel thérapeutique avéré.
- Détectable dans le LCR ou plasma via ddPCR ou MPS.



Drandi D et al., *Haematologica*. 2018;
Calimeri T et al., *Lancet Haematol*. 2024



Contexte et justification
scientifique



Objectifs de l'étude

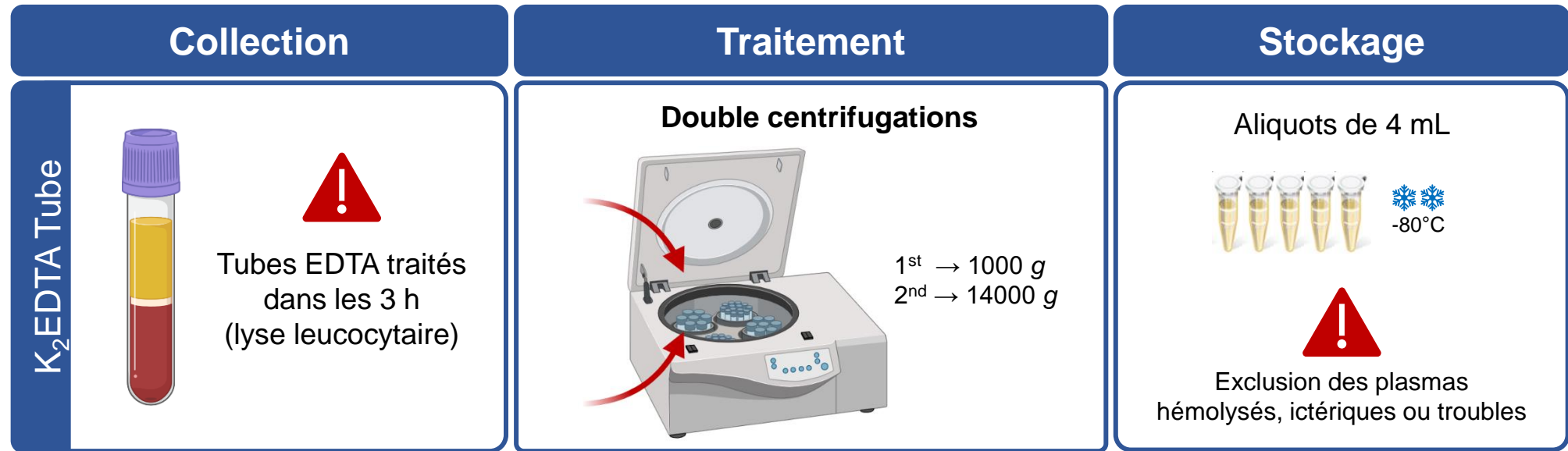
- Comparer l'efficacité de trois méthodes d'extraction d'ADNcf à partir de plasma humain :
 - ▶ Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid (manuel)
 - ▶ Promega Maxwell® RSC ccfDNA LV Plasma (semi-automatisé)
 - ▶ Promega Maxwell® RSC Rapid ccfDNA (automatisé)
- Développer et valider un test de ddPCR pour détecter la mutation L265P de *MYD88*
- Évaluer la faisabilité de l'analyse de cette mutation sur ADNcf plasmatique dans un contexte clinique



Mise au point



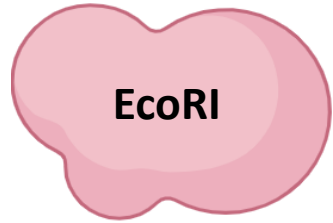
Préparation des échantillons de plasma



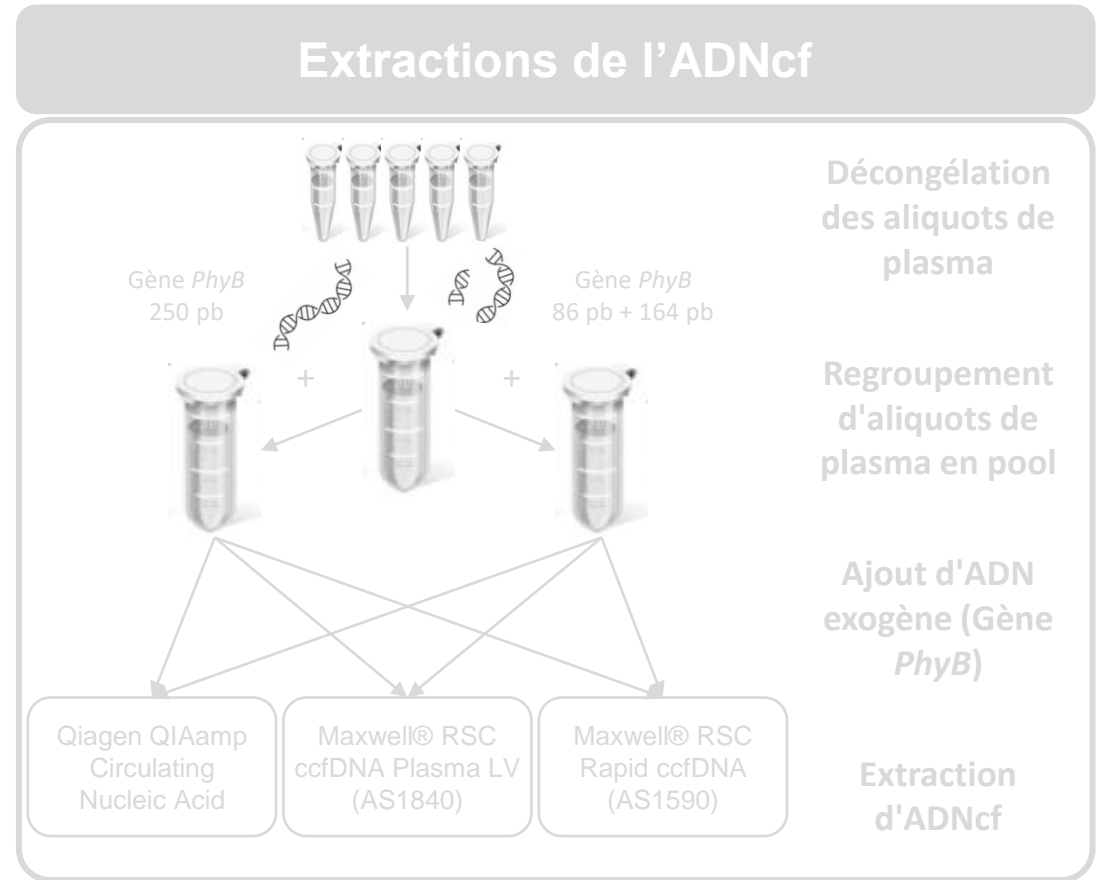
Méthodologie



ADN exogène « spiking »



gène *phyB*
Solanum tuberosum
(GenBank : Y14572.1)

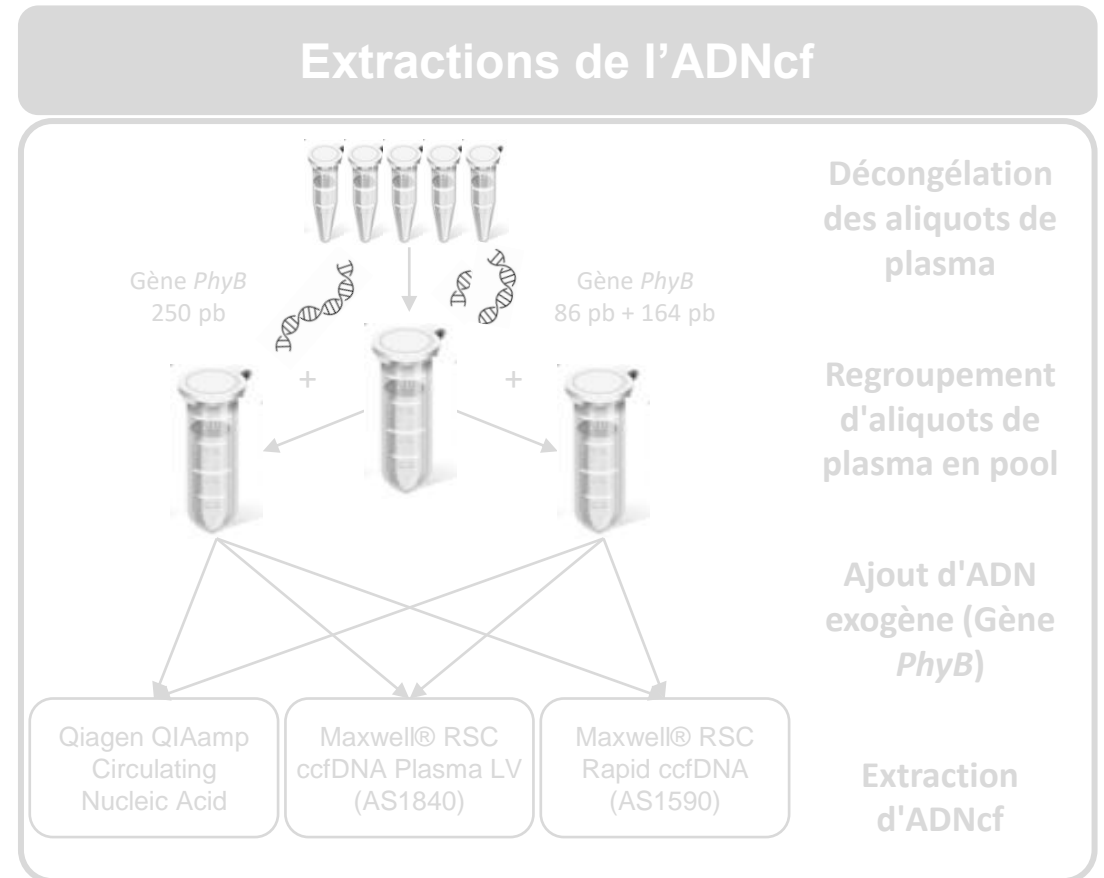


Méthodologie



ADN exogène « spiking »

gène *phyB*
Solanum tuberosum
(GenBank : Y14572.1)



Méthodologie

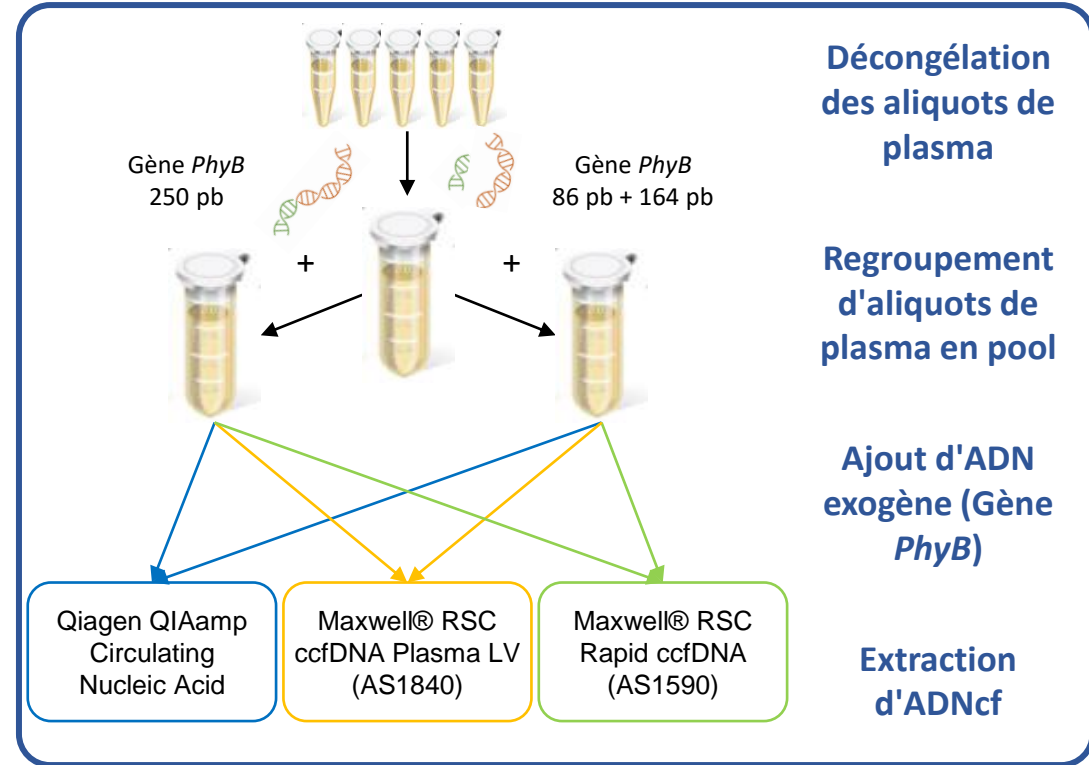


ADN exogène « spiking »

gène *phyB*
Solanum tuberosum
(GenBank : Y14572.1)



Extractions de l'ADNcf



Méthodologie



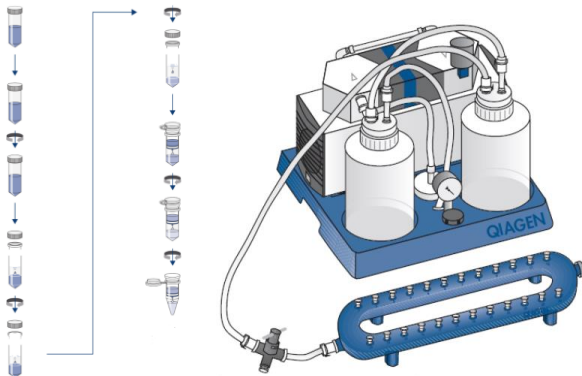
Kits d'extraction évalués

Extractions de l'ADNcf



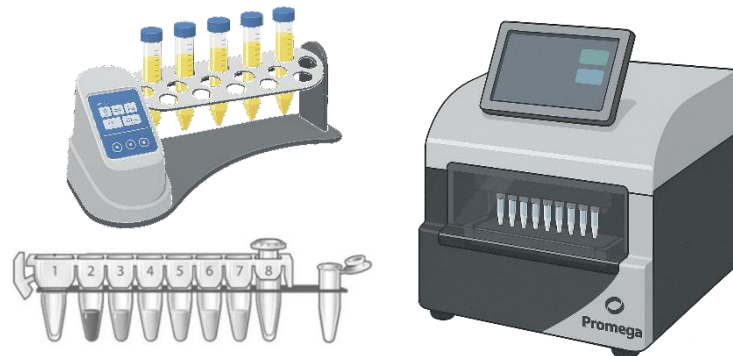
QIAamp Circulating Nucleic Acid

- Méthode manuelle
- Colonnes de silice
- Incubation avec protéinase K, fixation sous vide
- Temps « hands-on » > 1 heure



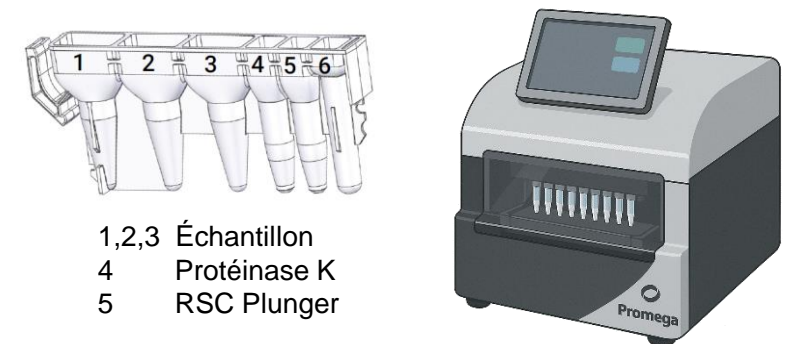
Maxwell® RSC ccfDNA Plasma LV

- Méthode semi-automatique
- Résine magnétique
- Prétraitement puis passage en cartouche Maxwell®
- Temps « hands-on » 15 minutes



Maxwell® RSC Rapid ccfDNA

- Méthode automatique
- Résine magnétique
- Cartouches pré-remplies + protocole Maxwell® intégré
- Temps « hands-on » < 5 minutes

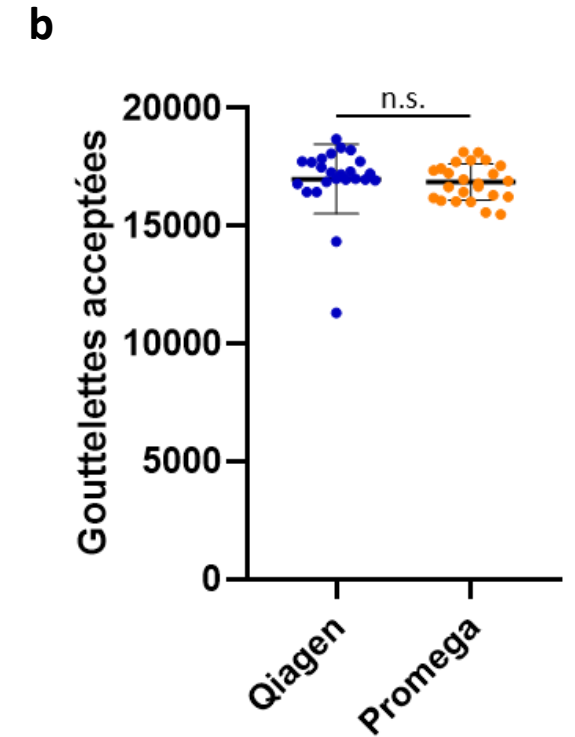
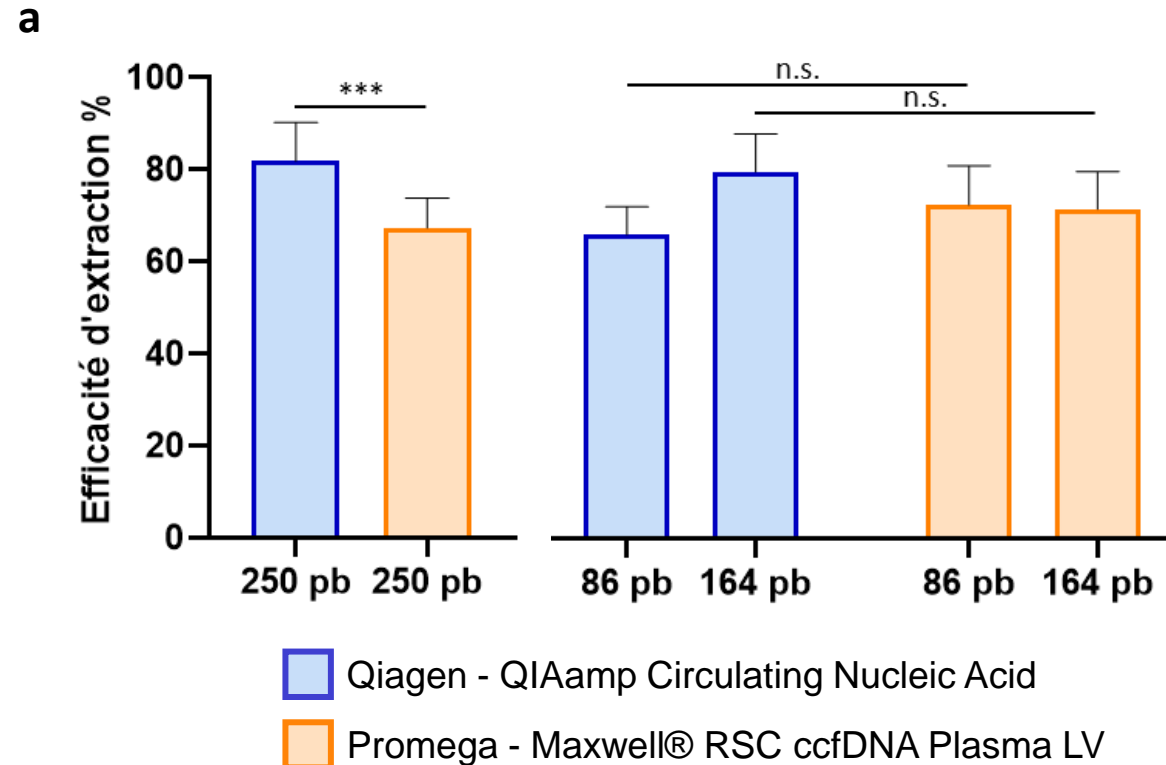


Méthodologie



Comparaison des kits Qiagen et Promega LV

- Meilleure récupération avec le kit Qiagen QIAamp pour les fragments de 250 pb ($p < 0,001$)
- Aucun avantage observé pour les fragments courts
- Pas de différences en termes de production de gouttelettes

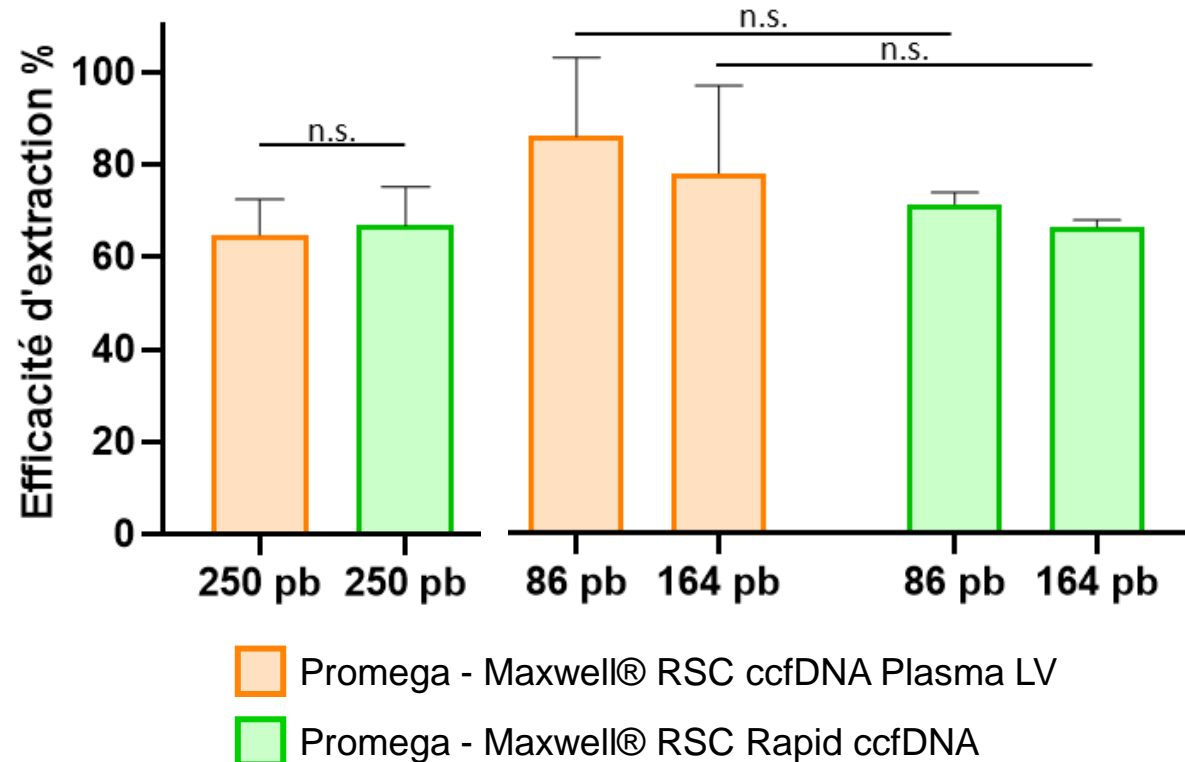


Résultats principaux



Comparaison des kits Promega LV et Rapid

- Efficacité similaire entre les kits Promega pour tous les fragments (250, 164, 86 pb)
- Aucune différence significative observée
- Meilleure homogénéité intra-échantillon pour le kit Rapid

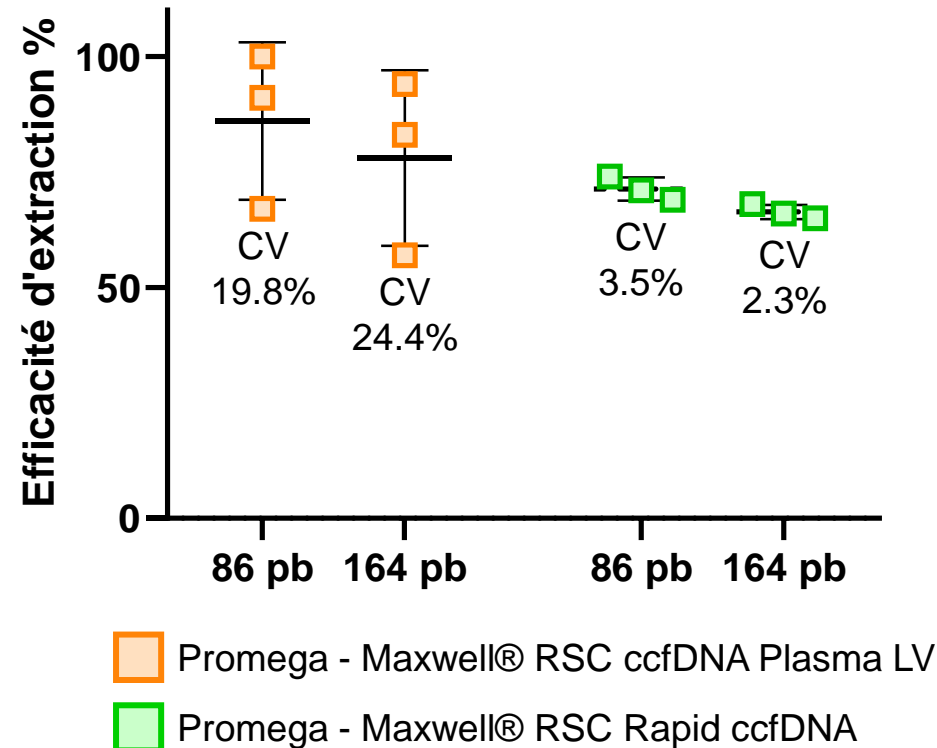


Résultats principaux



Comparaison des kits Promega LV et Rapid

- Efficacité similaire entre les kits Promega pour tous les fragments (250, 164, 86 pb)
- Aucune différence significative observée
- Meilleure homogénéité intra-échantillon pour le kit Rapid



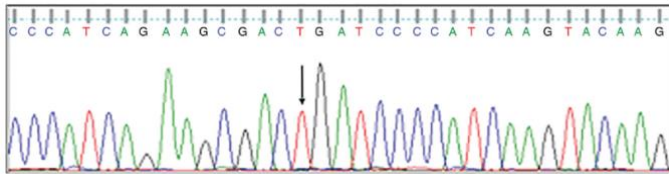
Résultats principaux



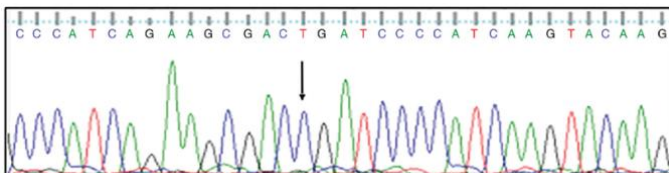
Mise au point ddPCR *MYD88* L265P

Échantillons

- Contrôles négatifs:
 - Myélome multiple non-IgM (n=33) *MYD88* sauvage

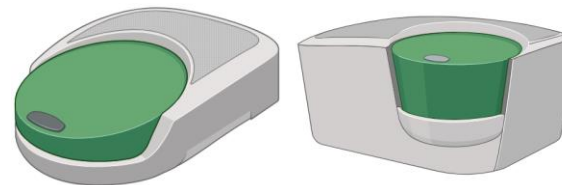
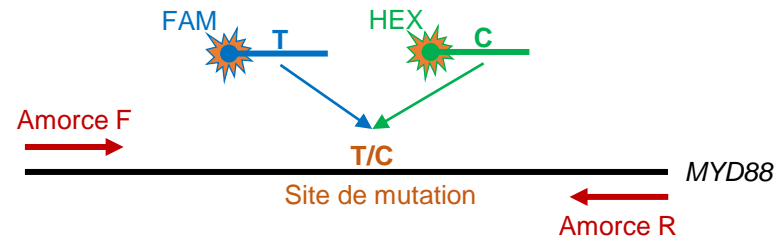


- Contrôles positifs:
 - Macroglobulinémie de Waldenström (n=22) *MYD88* mutés



Stratégie ddPCR

- ddPCR avec sondes
 - FAM (mutant)
 - HEX (sauvage)



Évaluation

- **LoB** évaluée sur les 33 MM non-IgM
- **LoD** évaluée sur échantillons de WM à faible VAF%
- **Linéarité** évaluée sur dilution en série d'échantillon à VAF connue
- **Reproductibilité** évaluée sur échantillons à VAF connues
- **Concordance avec MPS** évaluée sur un panel d'échantillons connus



Méthodologie



Sensibilité analytique du test ddPCR

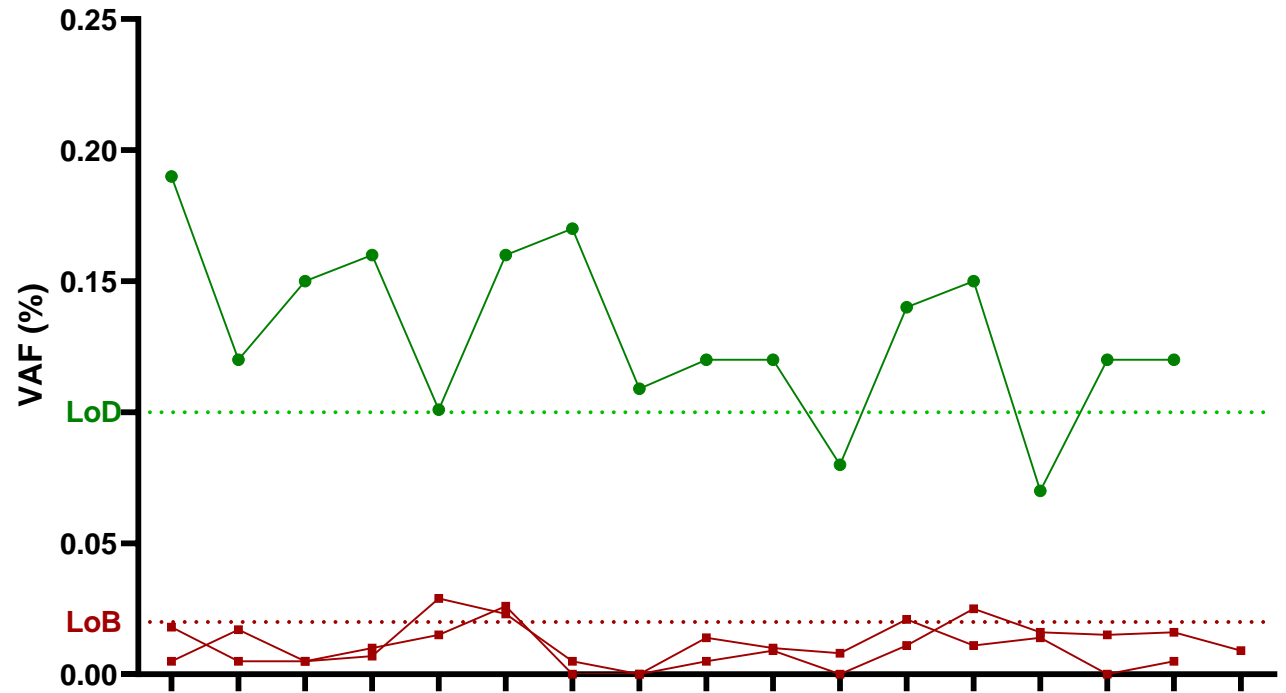
- **LoB** (“Limit of Blank”) : **0,02 %**

$$LoB = \mu_{blancs} + (1.645 \times \sigma_{blancs})$$

- **LoD** (“Limit of Detection”) : **0,1 %**

$$LoD = LoB + (1.645 \times \sigma_{\text{échantillons } \downarrow \text{conc}})$$

μ = moyenne
 σ = écart type



CLSI document EP17-A2. 2012

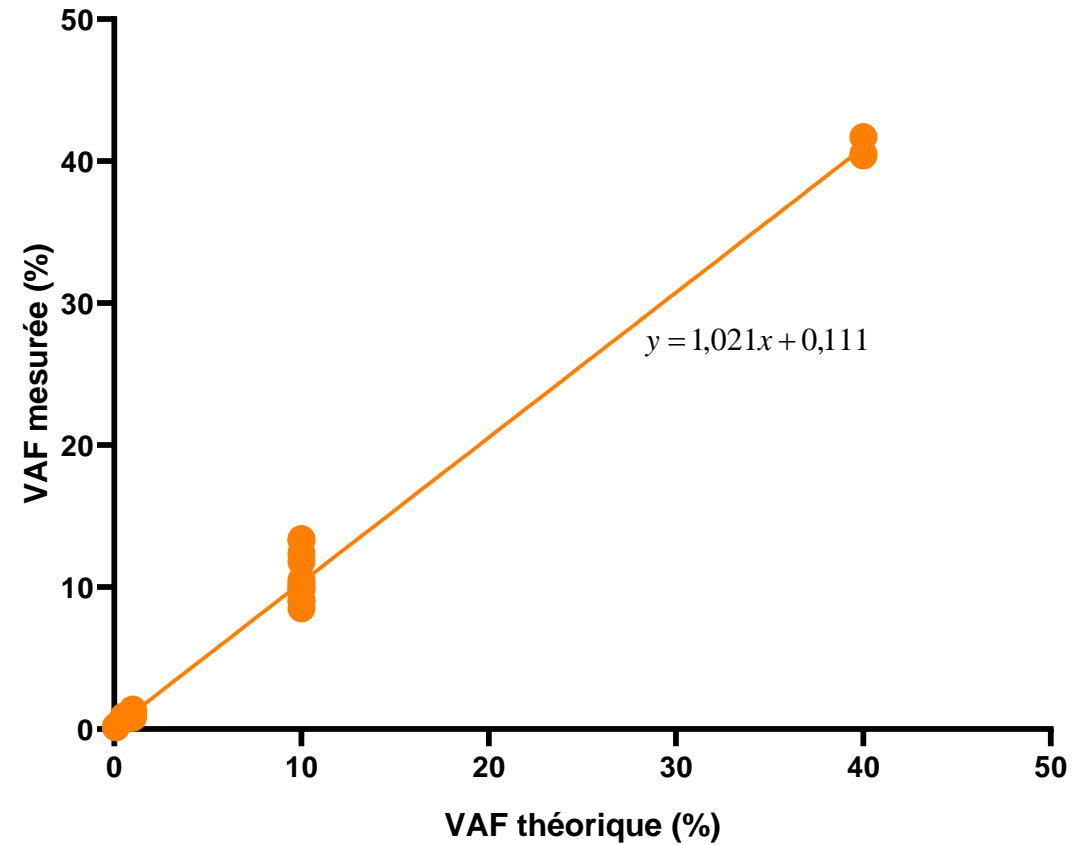


Résultats principaux



Linéarité de la quantification mutationnelle

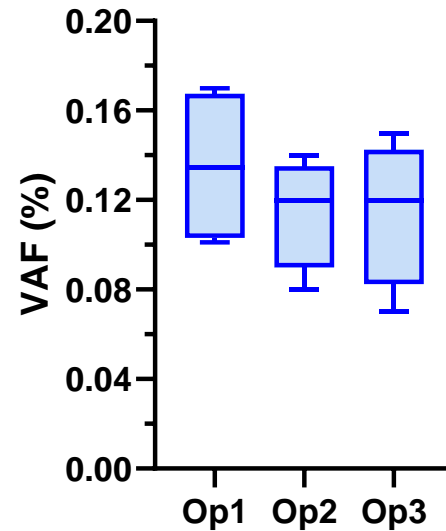
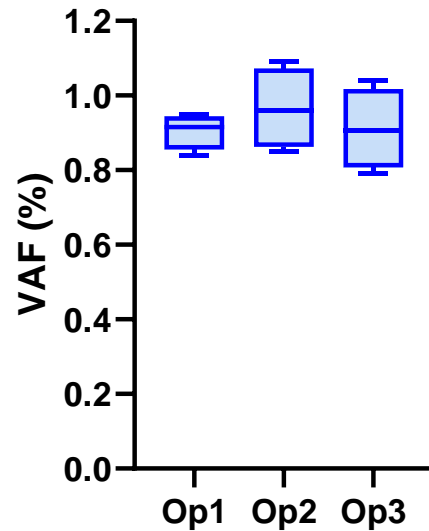
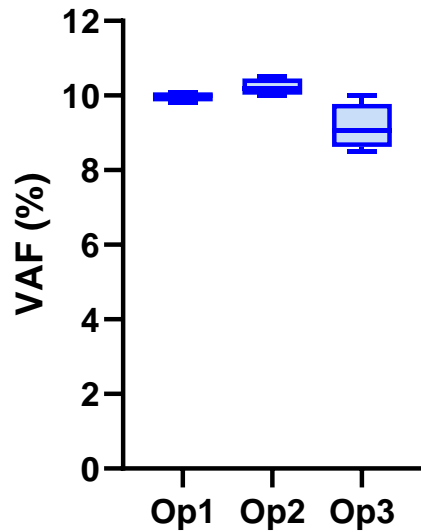
- Forte corrélation entre VAF mesurée par ddPCR et dilutions théoriques
- $r^2 = 0,9945$ ($p < 0,001$)



Résultats principaux



Répétabilité et variabilité inter-opérateur



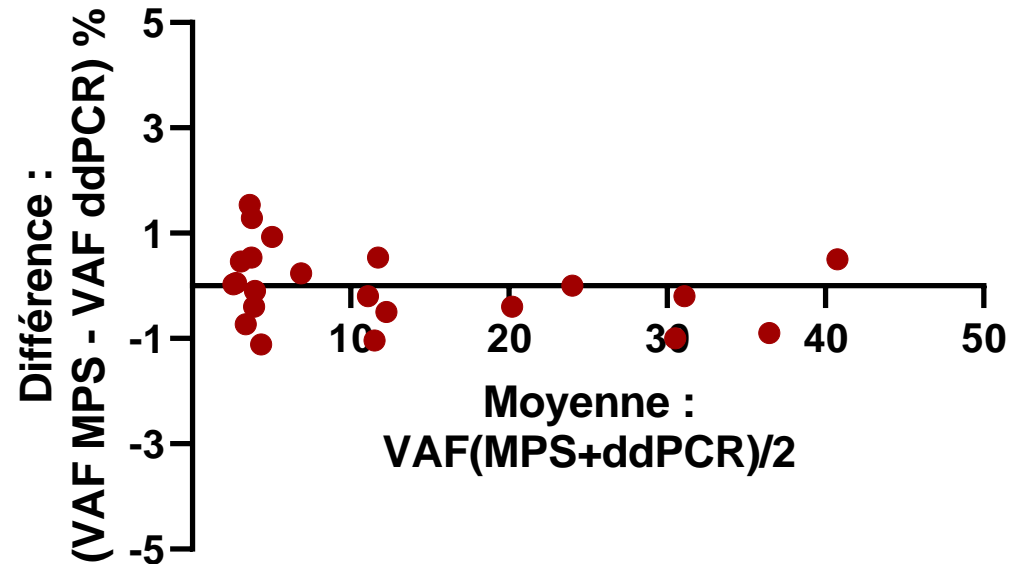
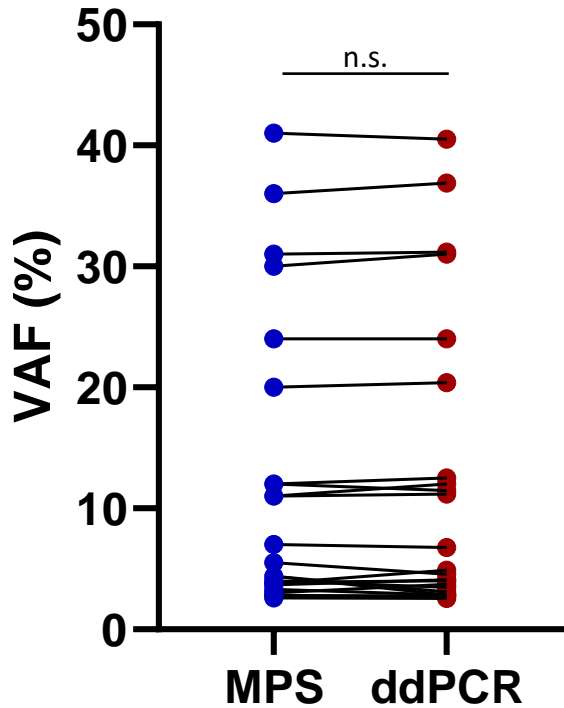
- Coefficient de Variation % :
 - 6,1 % (10 % VAF),
 - 9,6 % (1 % VAF),
 - 24,7 % (0,1 % VAF)
- Faible variabilité entre opérateurs ($p = 0,399$, ANOVA)
- Bonne répétabilité intra-opérateur



Résultats principaux



Comparaison des méthodes ddPCR et MPS



- VAF moyennes similaires
 $p = 0,872$
- Biais minime : $-0,021\%$
- Bonne corrélation → interchangeabilité des méthodes

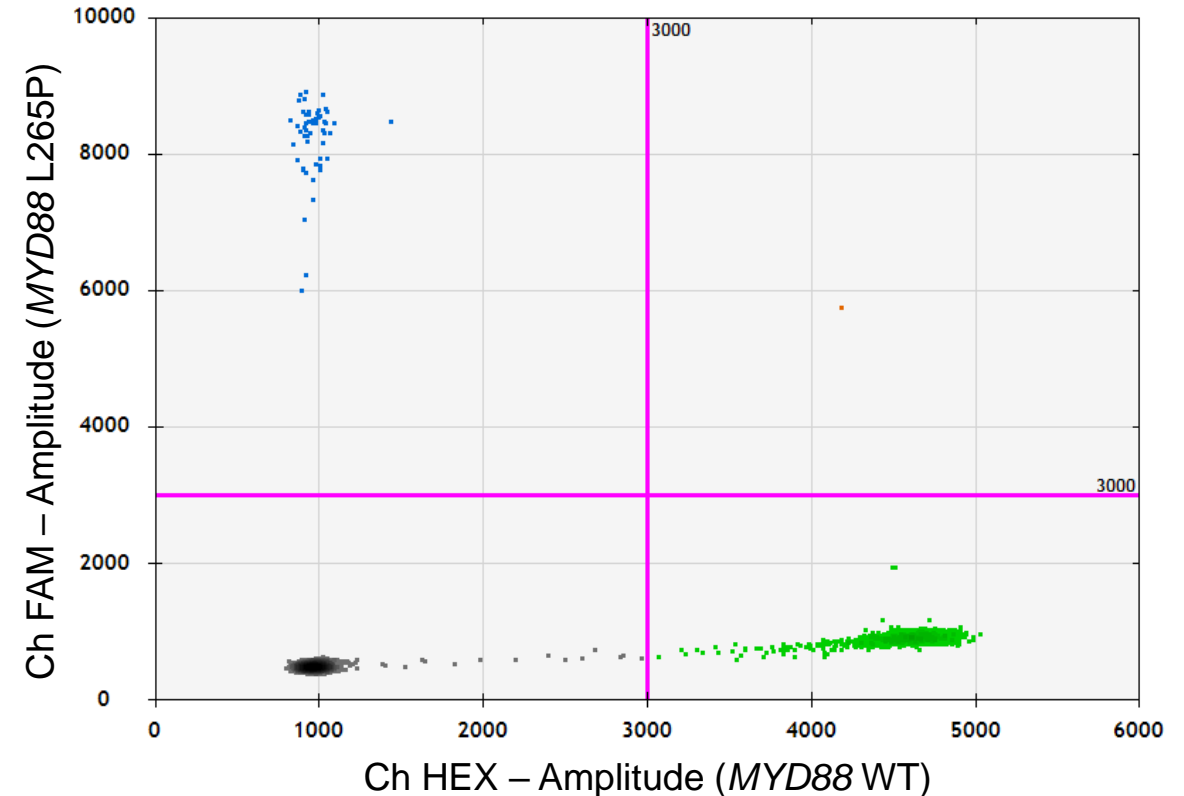


Résultats principaux



Preuve de concept sur ADNcf

- Trois cas de patients avec suspicion de lymphome B
 1. Génotype sauvage (WT) de *MYD88*
 2. Détection concordante de *MYD88* L265P ADNcf (3,6 %, ddPCR) et ADNg (26 %, MPS)
 3. Détection de *MYD88* L265P sur plasma ADNcf (0,6 %, ddPCR) et WT ADNg (MPS)
- Confirmation de la faisabilité sur ADNcf plasmatique



Résultats principaux



Discussion des résultats

- Le kit Qiagen montre une meilleure récupération des fragments longs (250 pb), mais peu pertinent en contexte clinique, car l'ADNcf tumoral est majoritairement court (90–150 pb).
- Le kit Rapid présente une efficacité équivalente mais une reproductibilité accrue : avantage pour les applications standardisées à haut débit.
- Le test ddPCR *MYD88* L265P est :
 - Sensible : LoD = 0,1 %
 - Précis : CV <10 % à 1 % VAF
 - Concordant avec le MPS : biais moyen -0,021
- Faisabilité par la preuve de concept sur ADNcf plasmatique.



Discussion



Discussion des résultats

- Limites de l'étude
 - Inclusion limitée d'échantillons plasmatiques.
 - Résultats cliniques basés sur un seul patient ► preuve de concept, mais pas de validation sur cohorte de patients.
 - Aucune donnée sur l'ADNcf issu du LCR, qui pourrait être plus pertinent pour les PCNSL.
 - Étude centrée uniquement sur *MYD88* L265P ► mutations additionnelles non explorées



Discussion



Conclusion

- La **biopsie liquide** est une méthode prometteuse pour le suivi des lymphomes agressifs.
- Le **test ddPCR développé** permet une détection fiable, sensible et reproductible de la mutation *MYD88* L265P.
- Cette étude pose les **bases méthodologiques** solides pour une application clinique future.



Conclusions et perspectives

Perspectives

- Élargir la cohorte à des patients atteints de PCNSL, DLBCL.
- Intégrer l'analyse de mutations additionnelles : *CD79B*, *CXCR4*, *EZH2*, *PIM1*.
- Validation inter-laboratoire ► standardisation des protocoles pour un déploiement clinique fiable.
- Coupler à des approches complémentaires :
 - Fragmentomique
 - Profil de méthylation

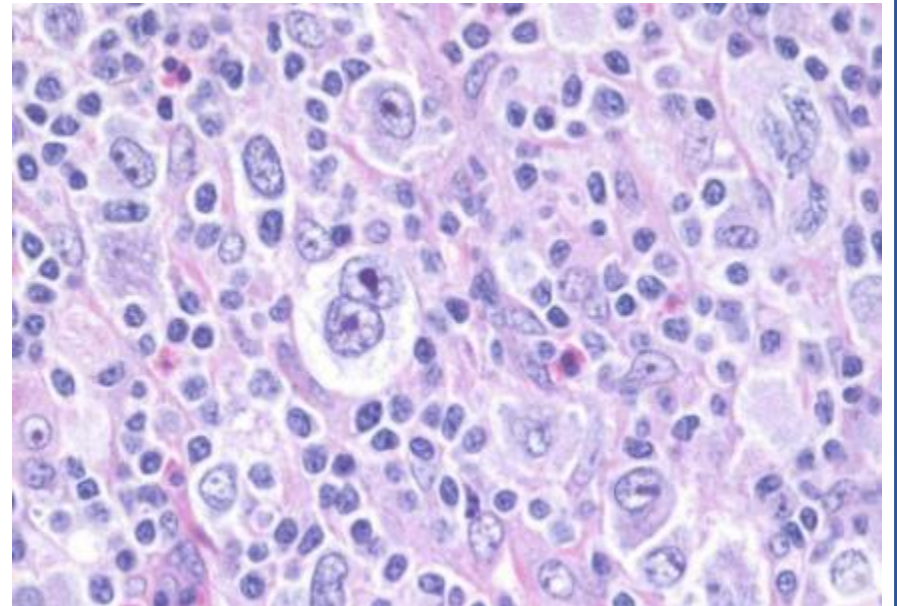


Conclusions et perspectives

ADNcf dans le lymphome de Hodgkin

- Cellules HRS rares → biopsies parfois difficiles à interpréter
- Forte libération de ADNcf par cellules HRS
- L'ADNcf reflète mieux l'hétérogénéité tumorale
- Identification d'altérations clés (*REL*, *PD-L1/PD-L2*, *STAT6*)

Lymphome de Hodgkin



Fangazio M & Dewispelaere L, *Curr Opin Oncol.* 2025



Conclusions et perspectives

Merci pour votre attention.