

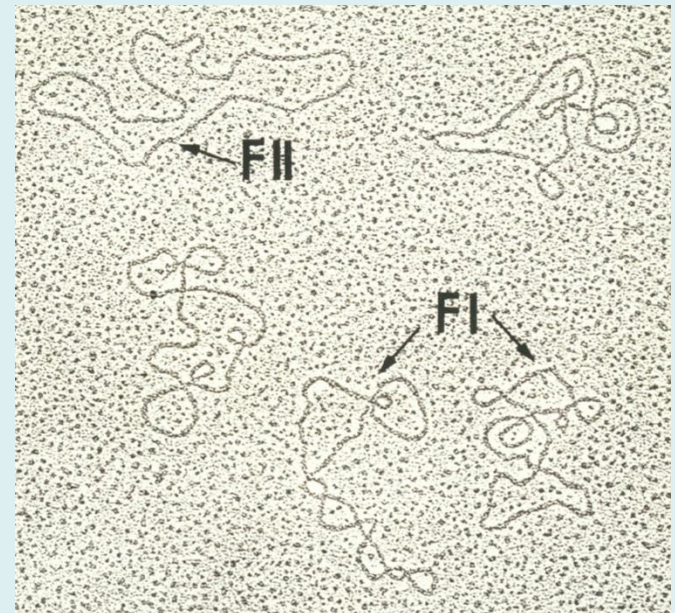
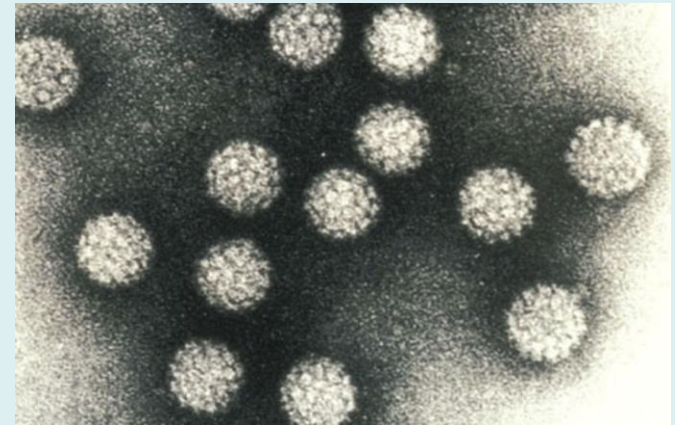
# Diagnostic sérique des cancers HPV-associés par capture et séquençage de l'ADN viral circulant

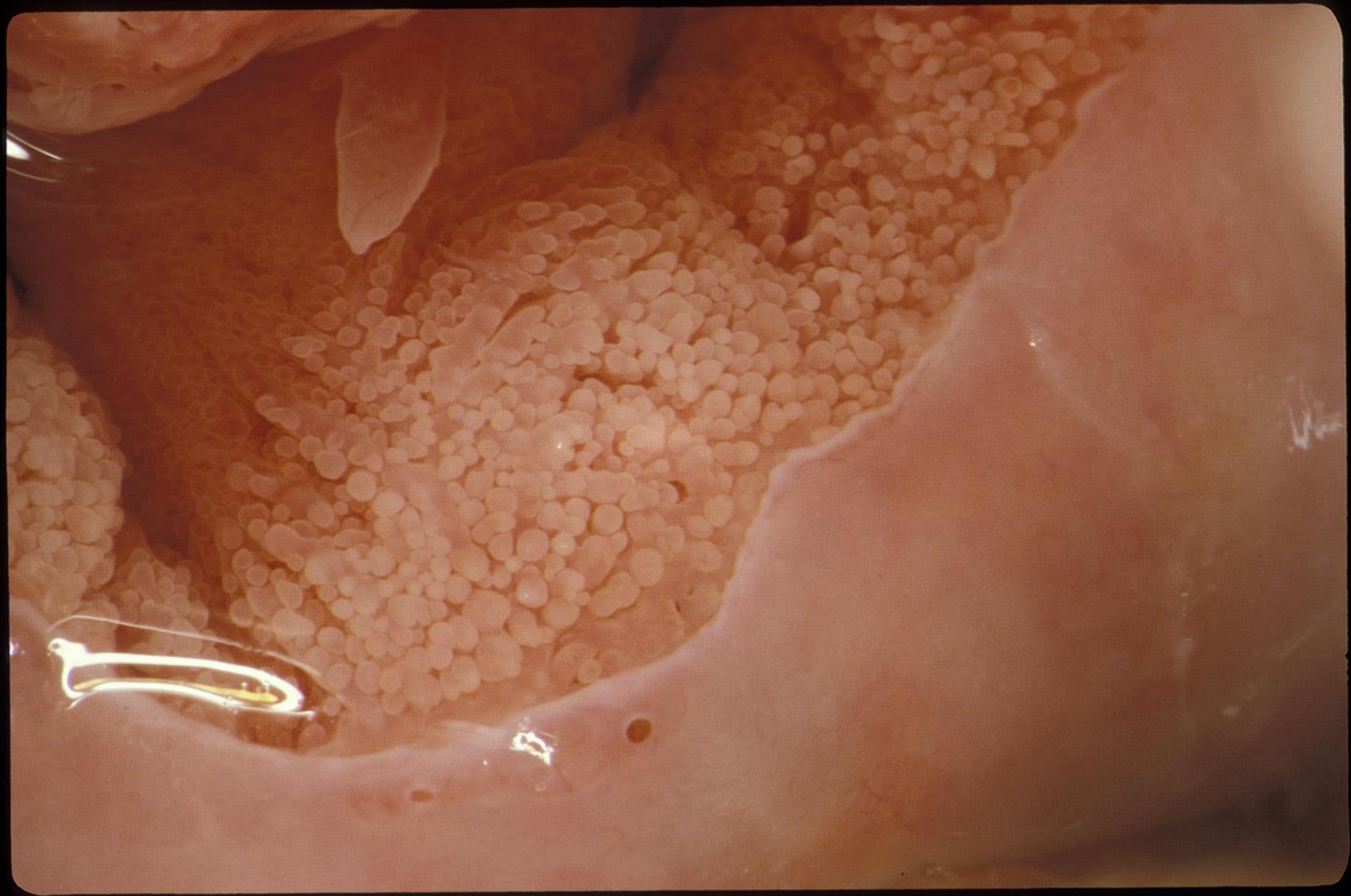
---

X. Sastre-Garau  
Service de Biopathologie  
Institut de Cancérologie de Lorraine

# Les papillomavirus humains (HPV)

- Capside icosaédrique (55 nm)
- ADN circulaire double brin (7900 pb)
- 200 génotypes
- Infectent la peau ou les muqueuses
- Spécificité du pouvoir pathogène
- Potentiel oncogène de certains génotypes (HPV 5, 16, 18...)





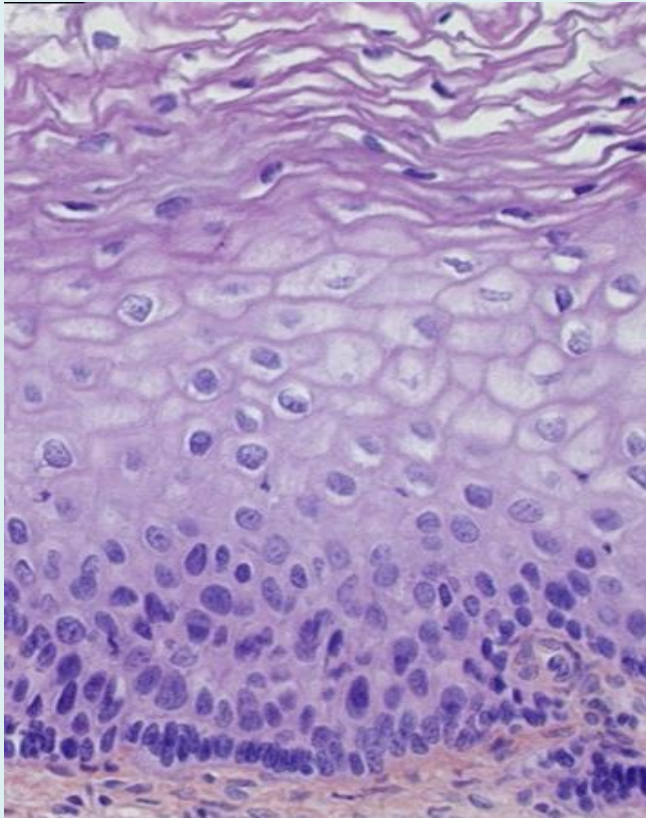
# Néoplasies cervicales

---

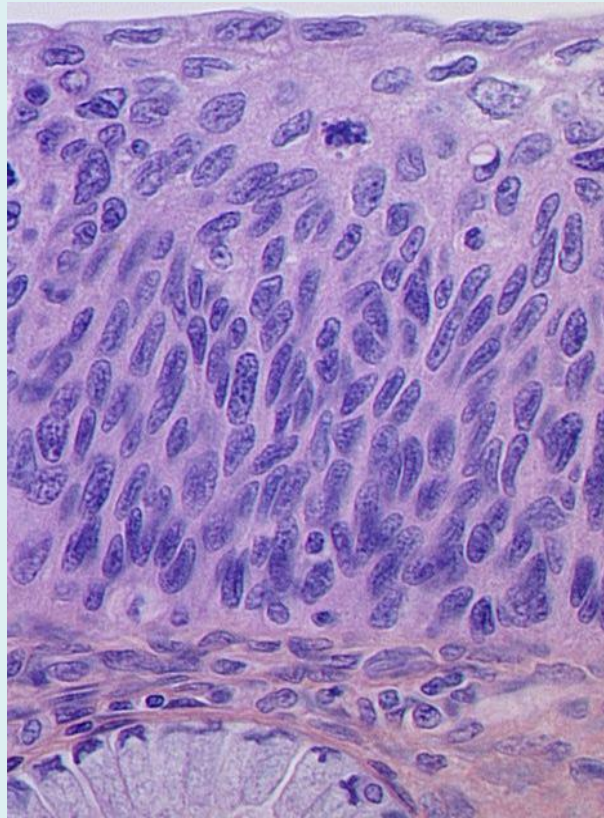
**Bas grade**

**Haut grade**

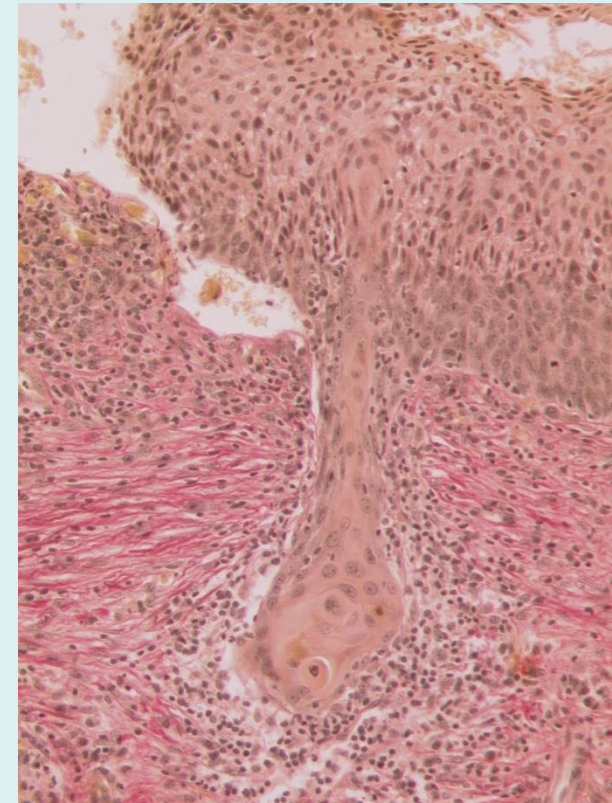
**Infiltrant**



20 ans



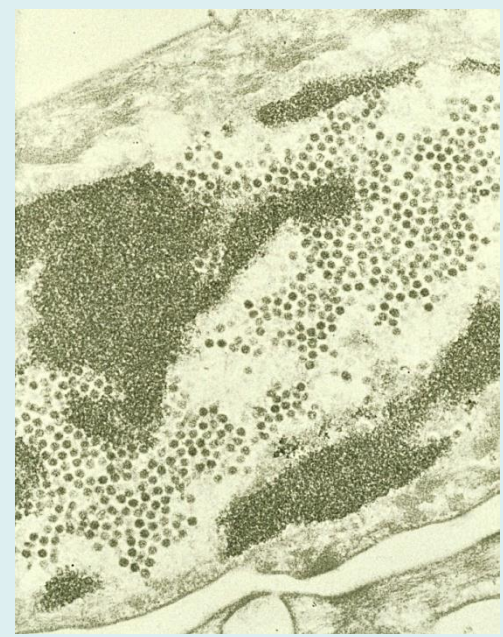
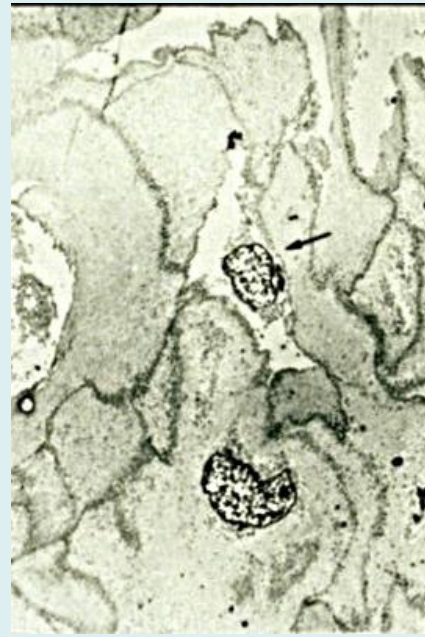
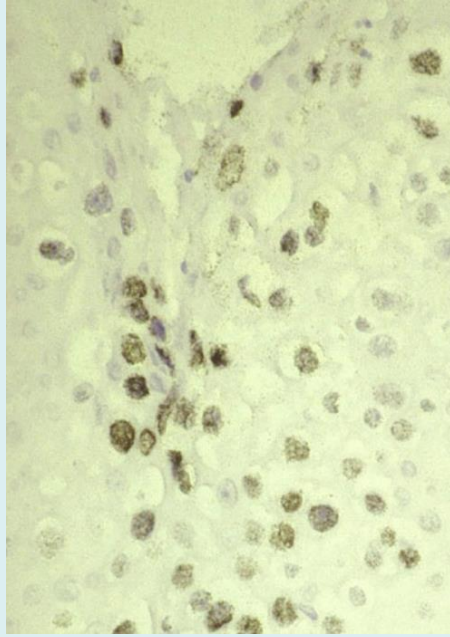
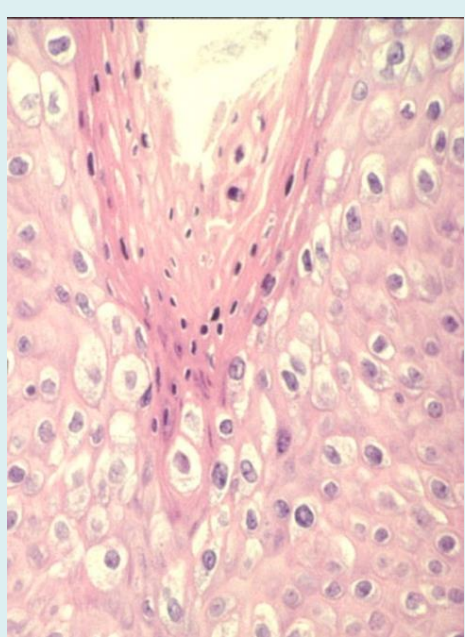
30 ans



40-50 ans

# Lésions de bas grade: génomomes viraux libres dans le noyau de la cellule hôte

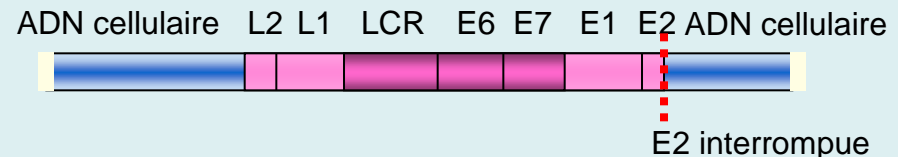
---



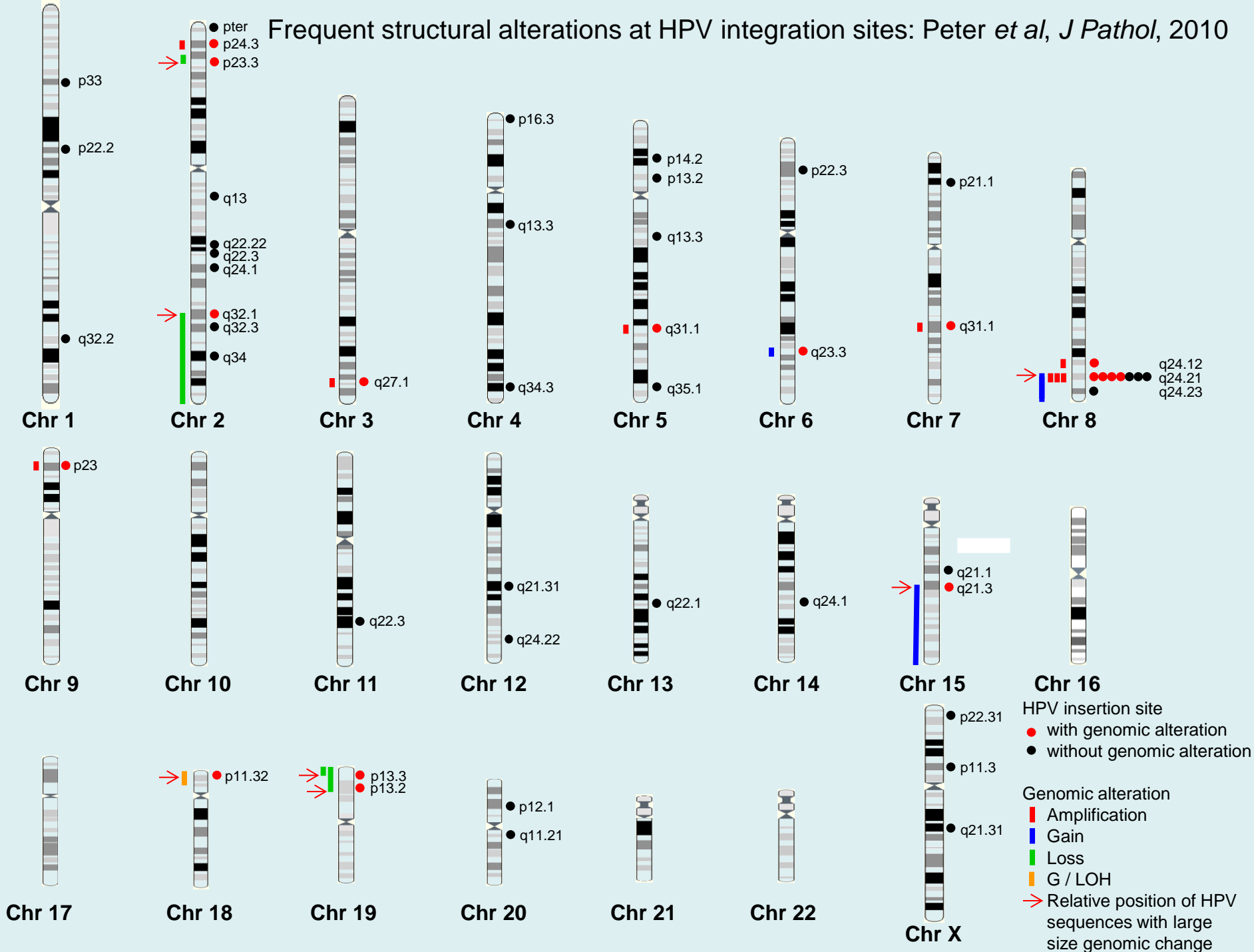
# Cancers: séquences d'ADN d'HPV intégrées dans le génome de la cellule hôte

---

- Étape de la transformation maligne
  - 5% des lésions de bas grade
  - 16% des lésions de haut grade
  - 80% des cancers infiltrants
- Modification de l'expression de gènes viraux
- Modification du génome cellulaire

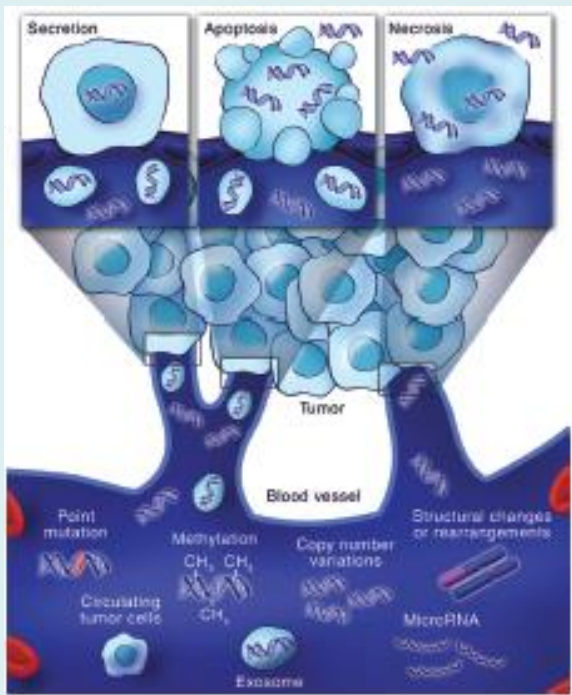


# Frequent structural alterations at HPV integration sites: Peter et al, J Pathol, 2010



# Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA

L.A. Diaz Jr & A. Bardelli, *JCO*, 32, 6, 579-586, 2014



## Applications des biopsies liquides

Détection précoce

Evaluation de l'hétérogénéité moléculaire de la tumeur

Suivi de la dynamique tumorale

Identification des déterminants génétiques cibles thérapeutiques

Evaluation de la réponse thérapeutique précoce

Suivi de la maladie résiduelle minime

Evaluation de la résistance au traitement en temps réel



## C-HPV DNA in patients with invasive cervical cancer

---

Author	Year	Review	N° of cases	Positivity (%)
Pornthanakasen	2001	BMC Cancer	50	6 (12.0%)
Dong	2002	Cancer Epid Bio & Prev	175	12 (6.9%)
Widschwendter	2003	Cancer Letters	94	42 (44.7%)
Yang	2004	Int J Gyn Cancer	50	28 (56.0%)
Sathish	2004	J Clin Virol	58	8 (13.8%)
Kay	2005	J Med Virol	45	11 (24.4%)
Ho	2005	Gynecol Oncol	60	16 (26.7%)
Gnanamony	2010	Gynecol Oncol	114	57 (50.0%)
			646	180 (27.9%)

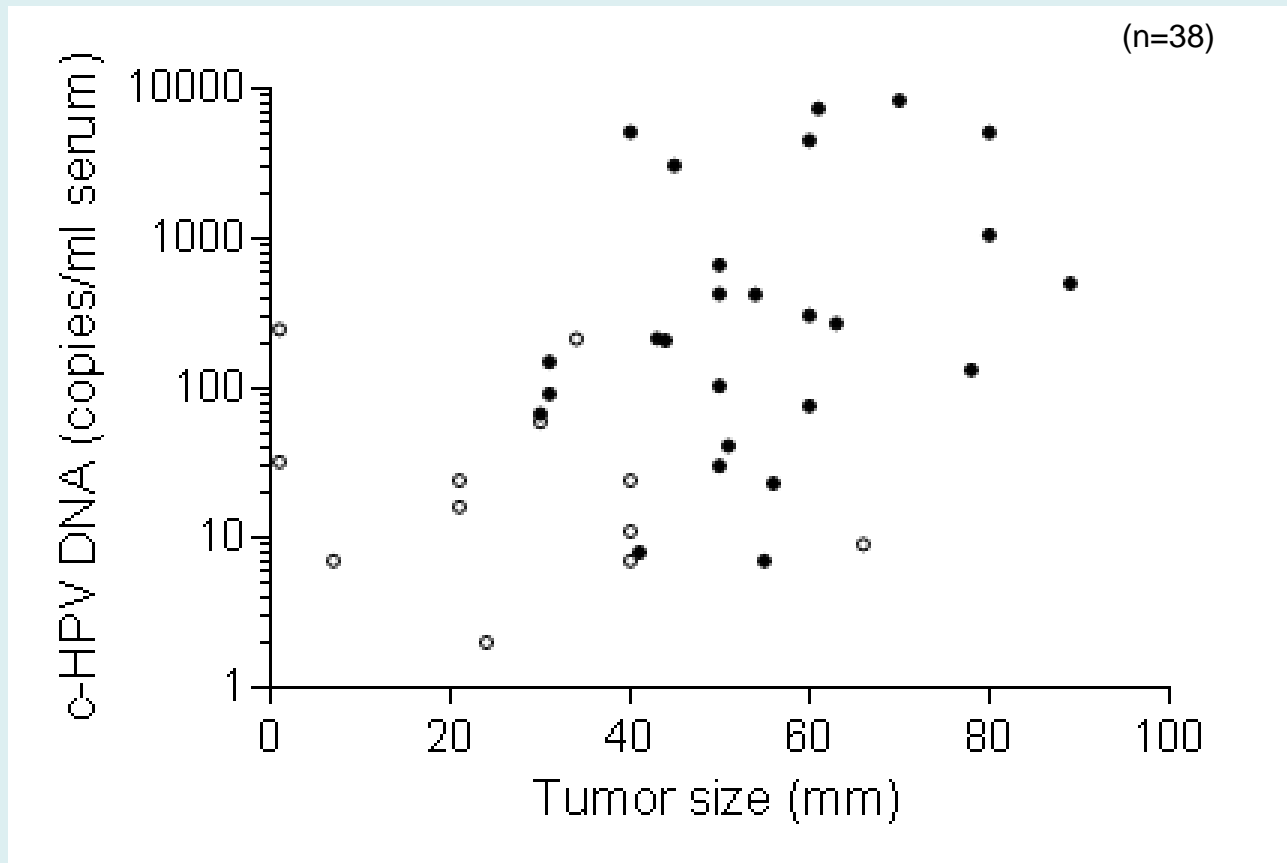
# Circulating HPV DNA detected using ddPCR in patients diagnosed with early stage HPV-associated invasive carcinoma.

*Jeannot et al., J Pathol: Clinical Res., 2016*

---

Tumor localization	Number of cases	Positive cases
Uterine cervix	47	39 (83%)
Anal canal	15	14 (93%)
Head & Neck*	8	8 (100%)
Total	70	61 (87%)
Serums preserved at -80°C	27	25 (93%)
CIN3	18	0 (-)

# Circulating HPV DNA level and tumor size/stage in patients with cervical cancer



Spearman correlation:  $r=0.48$  ( $p=0.003$ )  
(○) Stage I and (●) stage II/III/IV tumors.

# Carcinomes infiltrants: données virologiques

---

HPV status	N° of cases	%
HPV Positive	494	95.9
HPV Negative	21	4.1
HPV 16	286	55.53
HPV 18	73	14.17
HPV 45	22	4.27
HPV 33	15	2.91
HPV 31	11	2.14
HPV 52	11	2.14
HPV 11, 35, 39, 53, 58, 59, 73	22	4.27
HPV X	54	10.49

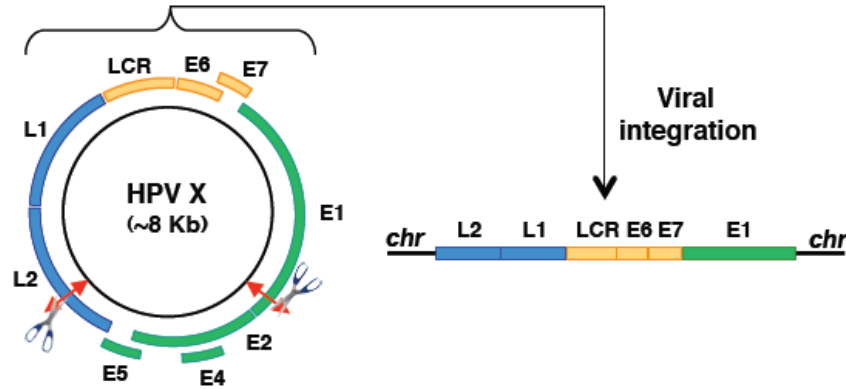
# Optimisation de l'approche méthodologique pour caractérisation de l'ADN viral dans les néoplasies

---

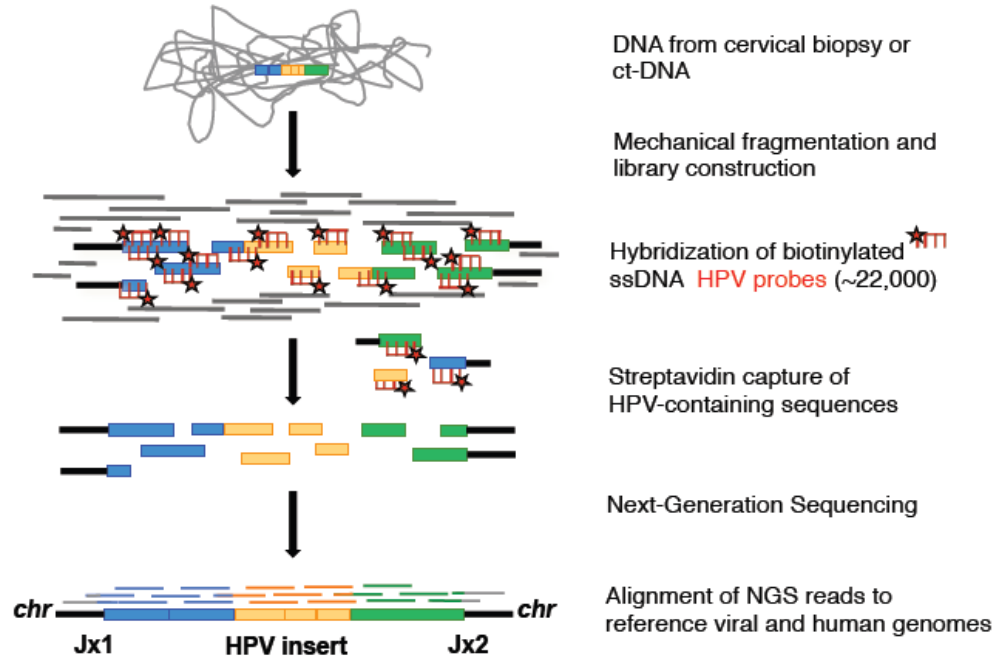
- Séquençage massif: en une seule étape:
  - Identification complète des séquences virales quel que soit le génotype
  - Détermination du statut viral: libre et/ou intégré
  - Identification des séquences cellulaires de jonction
  - Gène cible de l'oncogenèse au site d'insertion?

# Capt HPV: capture et séquençage des séquences virales et cellulaires contigües

A



B



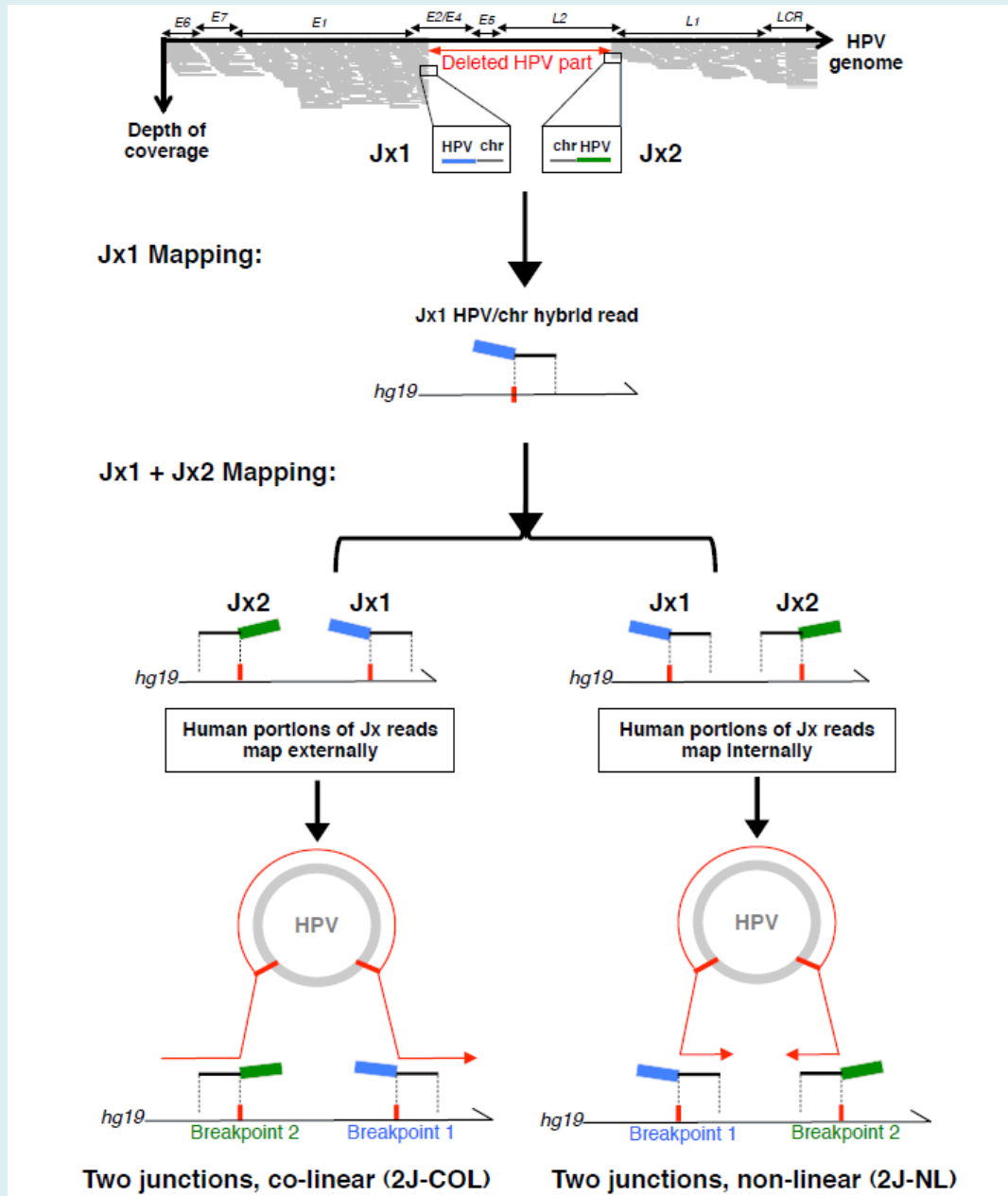
# Mechanistic Signatures of HPV Insertions in Cervical Carcinomas

Holmes *et al.* *Nature Genomic Medicine* 2016

---

- Série rétrospective de 72 cas de cancers du col
- HPV genotypes
  - HPV16, 18, 73, 31, 33, 45, 51, 52, 68, 6, 42
  - deux cas HPV négatifs
- Hétérogénéité des inserts viraux
  - de 25% à 96.8% du génome viral intégré
  - Interruption de E1/E5 et de L1/L2
  - conservation de OR et des gènes E6/E7
    - Un cas (HPV51) avec perte de E6 et de E7
    - Deux cas avec conservation de E2
- Profil d'intégration: signatures moléculaires

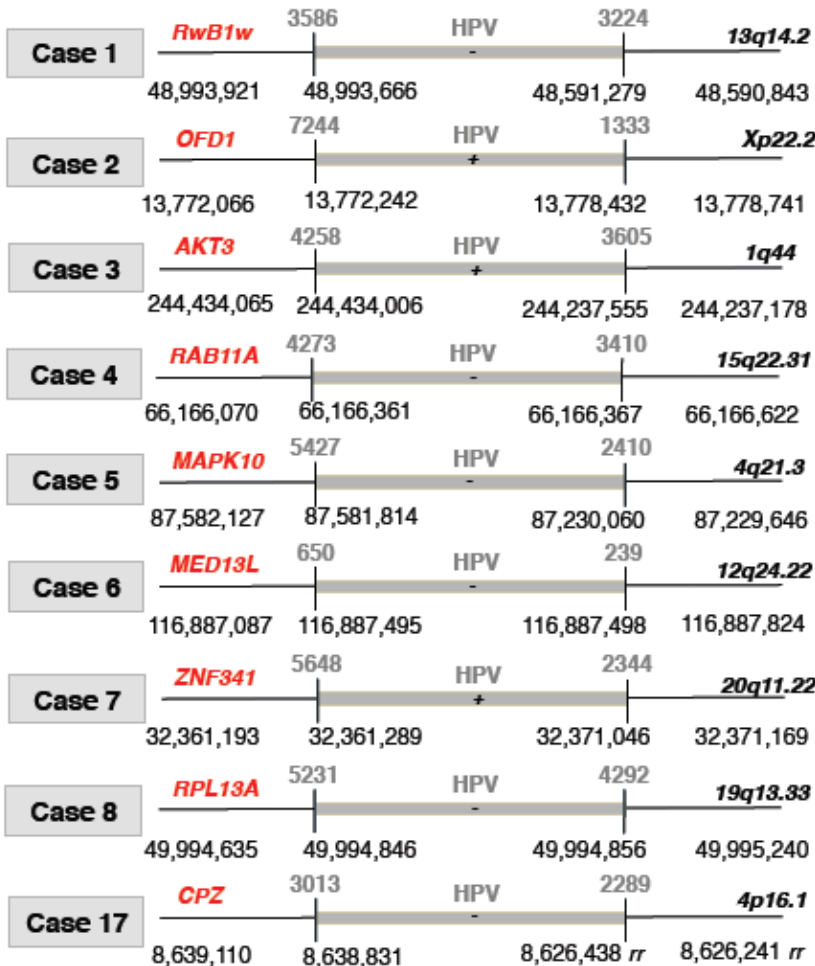
# HPV signatures 2J-COL and 2J-NL



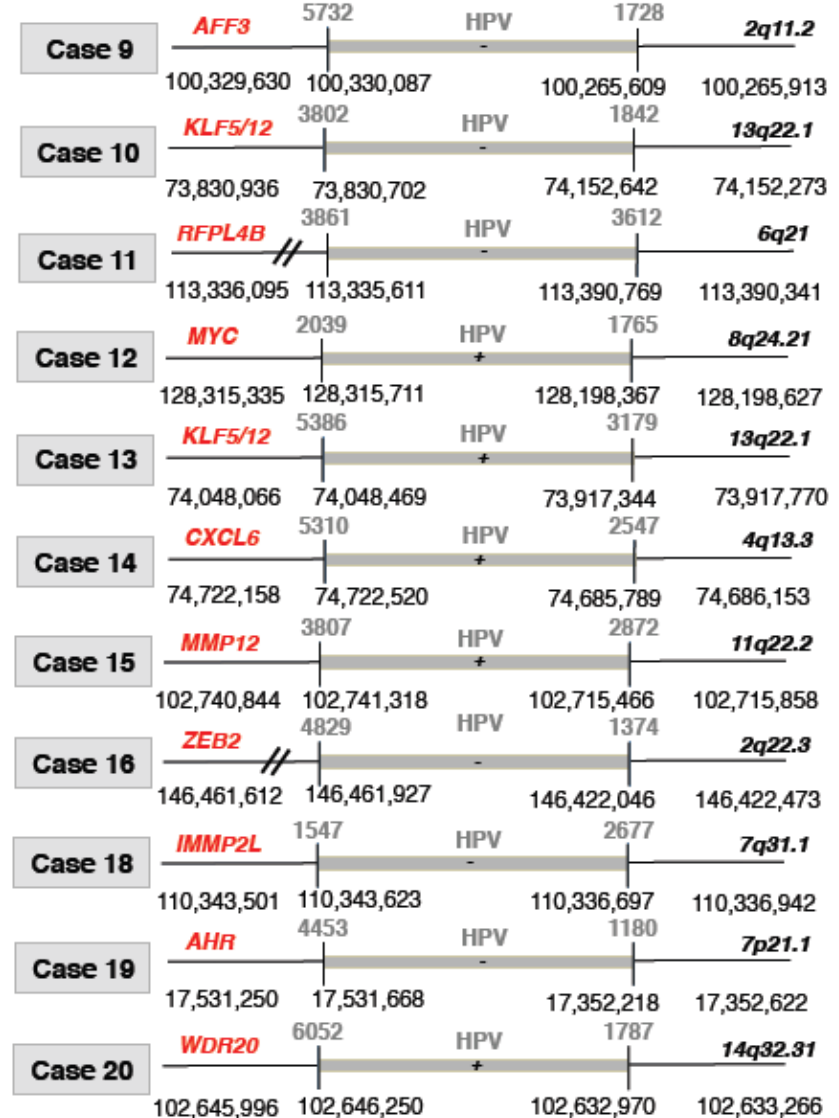


# 2J-COL & 2J-NL HPV signatures

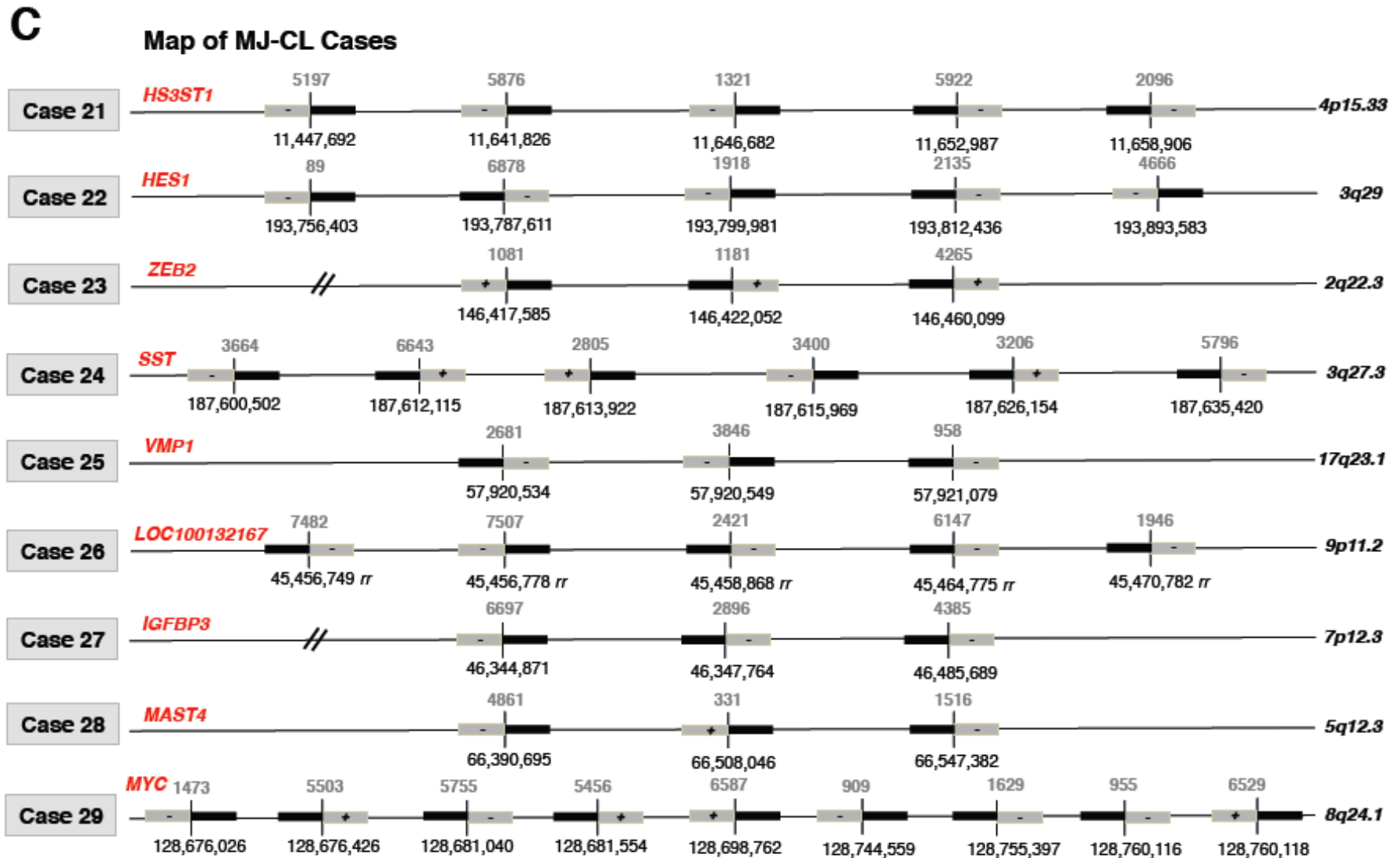
## 2J-COL



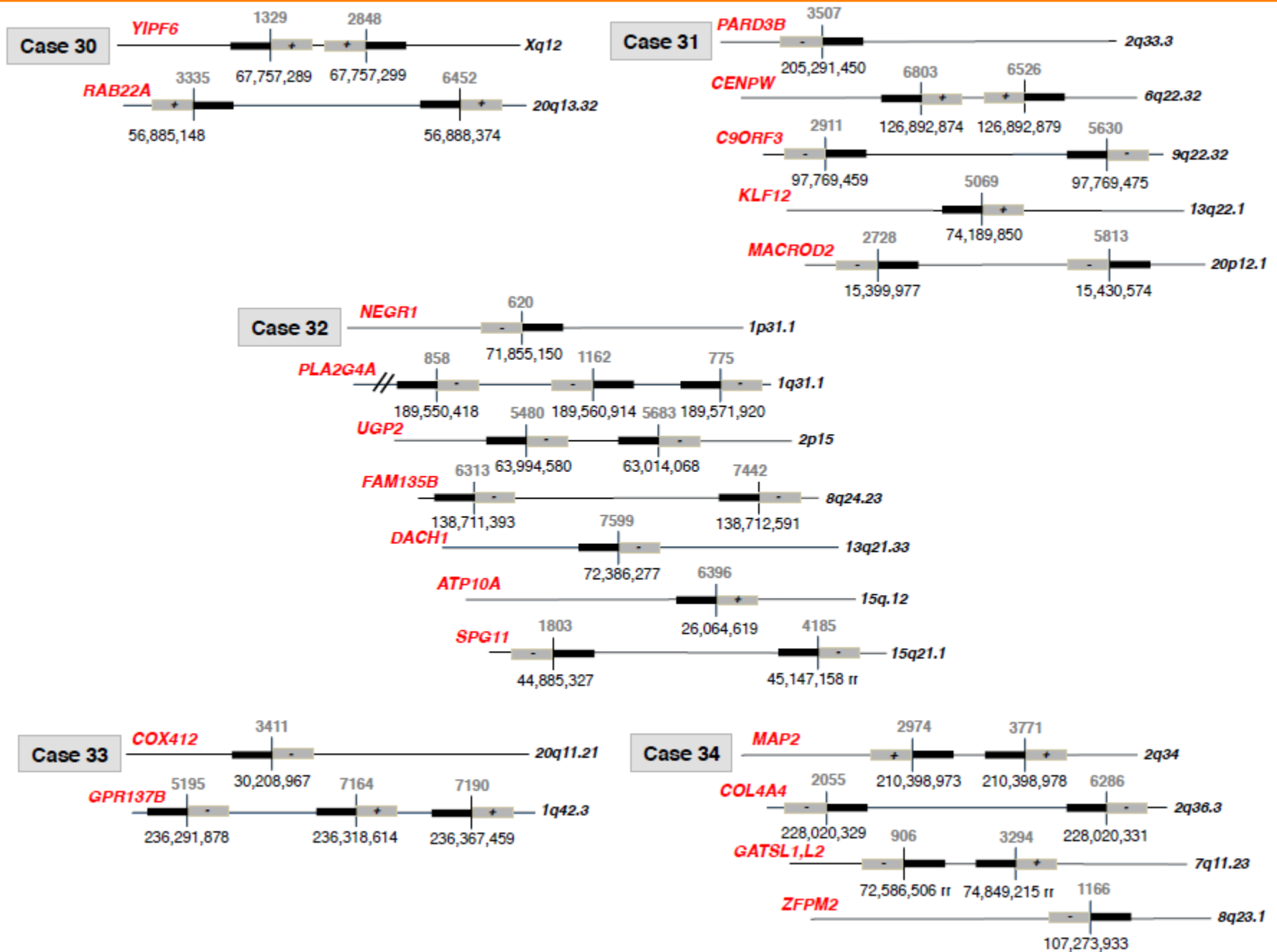
## 2J-NL



# Multiples Junctions « clustered » (MJ-CL) signature



# Multiple Junctions « scattered » (MJ-SC) signature



## Episomal (EPI) Signature

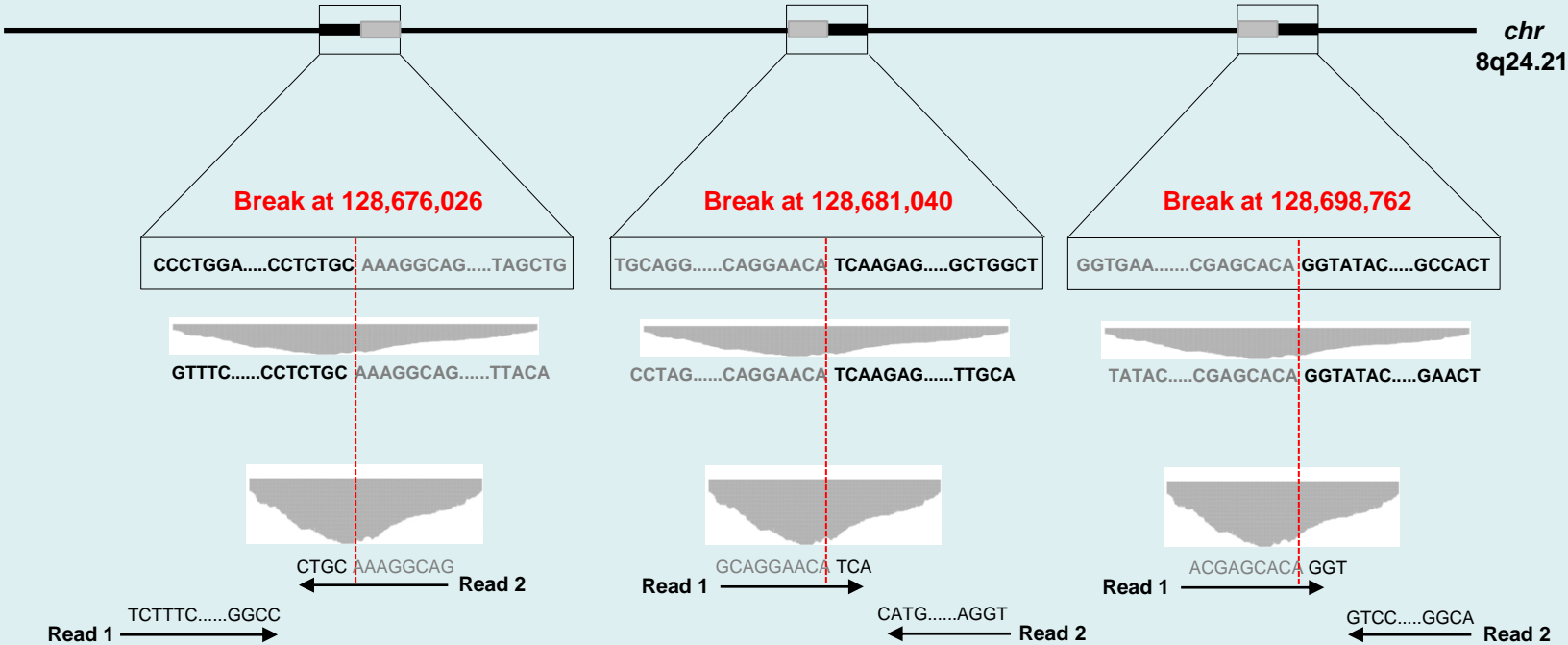
---

- Observée dans 29% (20/70) des cas
  - Couverture complète du génome
  - Pas de séquences de jonction

# Capture HPV-NGS on ctDNA and tumor: 5 cases

Case 29 (MJ-CL)

Integrated HPV into host chromosome



454 Single Reads  
~500 nt  
from **tumor**

Illumina reads  
Paired-End  
2x150 nt  
from **blood**

**Même profil dans tumeur et sérum**

# Capture HPV-NGS on ctDNA

---

- Possibilité de caractérisation moléculaire à partir d'un échantillon de sérum sans analyse préalable de la tumeur primaire
- Nouvel outil pour le **diagnostic sérique des carcinomes infiltrants HPV-associés.**

# Projet CaptHPV: Un test sérique pour le diagnostic de cancer HPV-associé ?

---

- Critères d'inclusion
  - Patients avec néoplasie potentiellement HPV-associée (col, anus, vulve, ORL)
- CaptHPV sur échantillon plasmatique (20 ml)
- Critère de jugement: histologie
- Sensibilité attendue: 96%
- Spécificité attendue: 99%
- Inclusion:
  - 100 patients
  - au moins 30 cas de cancer infiltrant HPV+

# Perspectives

---

- **Caractérisation virale des cancers HPV-associés (vulve, anus, tête & cou)**
  - Signature insertionnelle et données viro-cliniques
  - Gènes cibles de l'intégration
  - Aspects cognitifs: MJ-SC et chromotripsis ?
- **ADN viral circulant et suivi longitudinal**
  - Dynamique du marqueur en cours de traitement ?
  - **Rechute biologique prédictive de rechute clinique ?**
- **Amélioration du pronostic des récurrences**
  - **Thérapeutiques ciblées/immunothérapie au stade de rechute infra-clinique**



# CONCLUSION

---

Modèle privilégié pour le développement des applications des techniques d'analyse à haut débit et l'évaluation de l'intérêt de l'ADN tumoral circulant en oncologie clinique

# Remerciements

---

- A Holmes
- E Jeannot
- A Nicolas
- C Charra
- D Peiffert
- A Harlé
- C Dubois
- C Ramacci
- C Depardieu
- JL Merlin
- A Leroux
- L Leufflen
- S Shaghayegh
- F Marchal
- G Dolivet
- J Salleron
- V Gillon
- L Fernandes
- M Vazel
- S Machinet