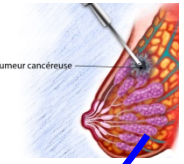
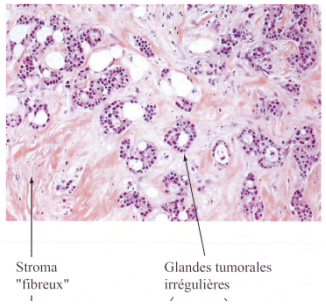
MARQUEURS TUMORAUX

Aspects fondamentaux et utilisation pratique

DU « Maladies du sein »
Vendredi 24 mars 2023
Nelly Bosselut

Marqueurs biologiques des cancers





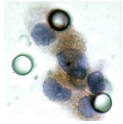
Cytologie
Marqueurs intra-tumoraux (IHC/FISH…)

DIAGNOSTIC

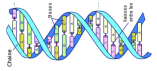
SUIVI

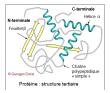
Marqueurs circulants

Cellules tumorales



Acides nucléiques





Protéines

Marqueurs protéiques sériques = « marqueurs tumoraux » classiques

I- Marqueurs tumoraux circulants « classiques » et cancer du sein

CA 15-3 et ACE

Les deux marqueurs tumoraux les plus utilisés dans le cancer du sein sont le CA 15-3 et l'ACE
Ils ne sont pas spécifiques et peuvent être élevés dans un autre contexte tumoral ou non

CA 15-3

- Cancer du sein
- Cancer de l'ovaire
- Cancer du pancréas
- Cancer gastrique
- Cancer du poumon
- Hépatite chronique
- Cirrhose
- Sarcoidose
- hypothyroïdie

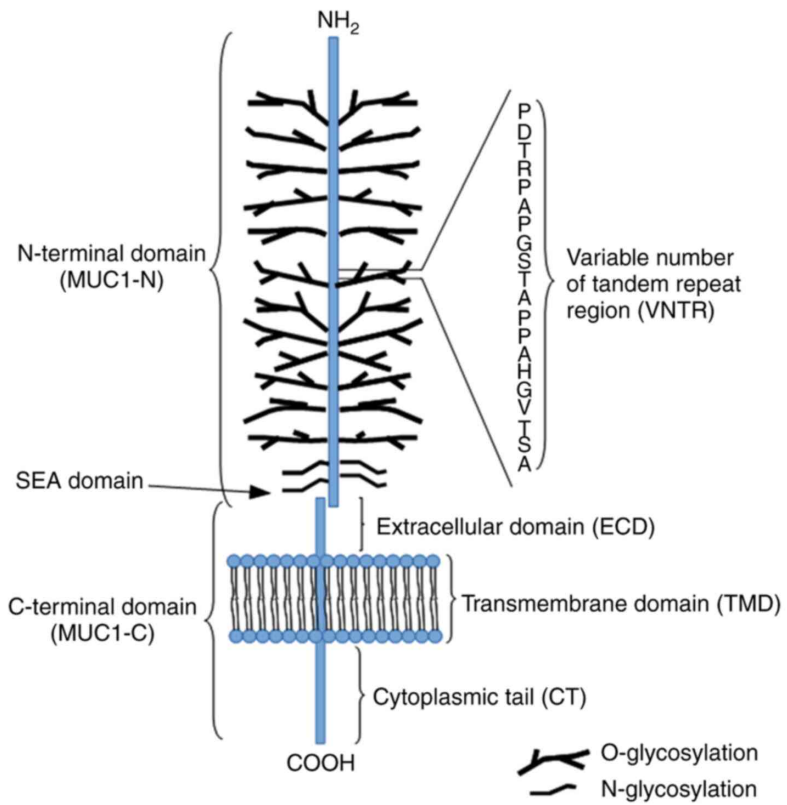
ACE

- Cancer du sein
- Cancer du pancréas
- Cancer de la thyroïde
- Cancer du poumon
- Tabagisme
- Cholécystite
- Cirrhose
- Diverticulite
- Pancréatite
- RCUH
- Cystadénome

CA 15-3 (1)

Gène MUC-1

- Protéine transmembranaire impliquée dans la protection, la lubrification et l'hydratation de la surface externe des tissus épithéliaux
- Partie extra-cellulaire glycosylée
- Surexprimée dans les cellules cancéreuses, rôle dans la prolifération tumorale et l'invasion



La partie extracellulaire de MUC-1 peut-être clivée par des protéases (ADAM17, MT-MMP1)

= formes solubles de MUC-1

CA 15-3 (2)

Il existe principalement deux formes solubles du gène MUC1

CA 15-3 +++	CA 27-29
Dosage par immuno-analyse	Dosage par immuno-analyse
Méthode sandwich	Méthode compétition
Deux anticorps monoclonaux	Un anticorps monoclonal

Performances cliniques différentes

CA 15-3 (3)

Utilisation du CA 15-3 en situation de dépistage du cancer du sein

Mauvaise sensibilité et spécificité

A proscrire

	Malades	**Sains**
Test > 0	VP	FP
Test < 0	FN	VN

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$VPN = \frac{FN}{FN + VN}$$

$$Sens = \frac{VP}{VP + FN} \qquad Spec = \frac{VN}{FP + VN}$$

Le CA 15-3 est élevé dans 30% des cas au diagnostic
9% des stades I
19% des stades II

CA 15-3 (4)

Utilisation du CA 15-3 en pré-opératoire chez des patientes déjà diagnostiquées

- Utilité controversé
- Mais valeur de référence pour le suivi post-opératoire
- Mauvaise sensibilité et spécificité pour les tumeurs de petites tailles et localisées
- Plus souvent élevé dans les situations métastatiques/stades avancés
- Plusieurs études ont montré une corrélation entre un CA 15-3 élevé au diagnostic en pré-opératoire et le pronostic
  - N+/N-
  - M+/M-
  - Indépendamment de la taille de la tumeur
  - RH+/RH-
  - Explication??? Détection de micro-métastases occultes??

EGTM recommande le dosage de CA 15-3 en pré-opératoire à visée pronostic

Une valeur de CA 15-3 élevée en pré-opératoire doit faire rechercher activement une dissémination métastatique

CA 15-3 (5)

Utilisation du CA 15-3 en surveillance après traitement curatif chez des patientes asymptomatiques

Evaluation de l’efficacité du traitement

- Normalisation du marqueur en post-op : possible bon pronostic
- Non normalisation : mauvais pronostique / inefficacité thérapeutique

CA 15-3 (6)

Utilisation du CA 15-3 en surveillance après traitement curatif chez des patientes asymptomatiques

- Possible détection pré-clinique d'une rechute
  Une élévation >30 U/mL (dosage tous les 4 mois) précèderait la rechute clinique de 9 mois (Wojtacki et al, 2001)

- Mauvaise sensibilité pour les récidives loco-régionales (20%)

- Meilleure sensibilité pour les récidives métastatiques (70%)
  - La sensibilité dépend du site métastatique
  - Elevée dans les localisations osseuses (68 à 81%), hépatiques (75%) et pulmonaires (50 à 70%)
  - Faible dans les localisations cutanées, ganglionnaires ou cérébrales (15 à 20%)

- Amélioration du pronostic???

- Avis divergent des sociétés d'expert

- En suivi, toujours utiliser la même méthode de dosage +++

- Favoriser la cinétique plutôt que la valeur seuil (temps de doublement)

CA 15-3 (7)

Utilisation du CA 15-3 en surveillance après traitement curatif chez des patientes asymptomatiques

Société d'expert	Recommandations de dosage du CA 15-3 après ttt curatif
ASCO	NON
ESMO	NON
NCCN	NON
EGTM	OUI
NACB	PARFOIS

ASCO : American Society of clinical Oncology
ESMO : European Society of clinical Oncology
NCCN : National comprehensive Cancer Network
EGTM : European Group on Tumor Markers
NACB : National Academy of Clinical Biochemistry

EGTM
Tous les 2-4 mois les 5 premières années
Puis tous les 6 mois les 3 années suivantes
Puis tous les ans

CA 15-3 (8)

Utilisation du CA 15-3 pour le monitoring des patientes métastatiques

EGTM
- dosage avant chimio puis tous les 3 mois
- définition d'une progression = + 25%
- définition d'une efficacité thérapeutique = - 50%

ASCO
Dosage du CA 15-3 en parallèle de l'imagerie/clinique ou seul si maladie non évaluable

NACB
- idem ASCO
- notion d'échec de traitement si deux augmentations successives de 30%

Recommandation de dosage en suivi d'efficacité de traitement
(même technique +++)

Pas de consensus sur la fréquence et sur la définition de l'efficacité/inefficacité

NB : des élévations transitoires de CA 15-3 peuvent être présentes après initiation du traitement en raison de la lyse tumorale

ACE (Antigen Carcino-Embryonic)

Glycoprotéine oncofoetale dont la synthèse est réduite mais persistante à la naissance.
Certains cancers induisent une dérépression de sa synthèse.
L'ACE appartient à la superfamille de immunoglobulines = nombreux épitopes immunogène donc nombreux anticorps monoclonaux donc nombreuses dispersion des résultants intertechniques.

Son utilisation seule est moins performante que le CA 15-3.
Une élévation isolée d'ACE est décrite chez 7 à 15% des patientes présentant une première évolution métastatique.

L' ANAES recommande de ne pas doser l'ACE sauf chez les patientes métastatiques qui n'expriment pas le CA 15-3.

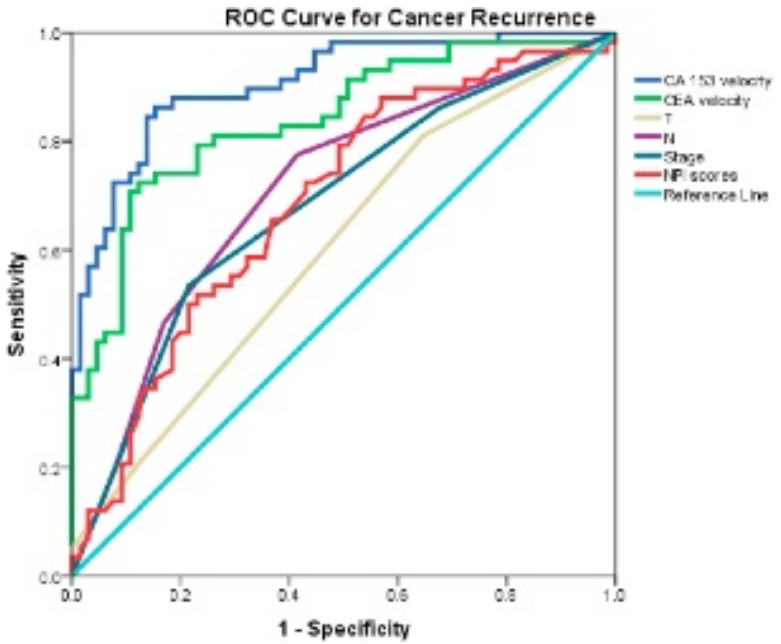
Vélocité des marqueurs tumoraux CA 15-3 et ACE

« Clinical utility of tumor marker velocity of cancer antigen 15-3 (CA 15-3) and carcinoembryonic antigen (CEA) in breast cancer surveillance », *Hing JX and al.; Breast (2020) 52:95-101*

$$V = \frac{TMa - TMb}{t \text{ (année)}}$$

Cut-off $V_{CA15\text{-}3}$ = 2,5 U/mL/an

Cut-off V_{ACE} = 1,2 ng/mL/an



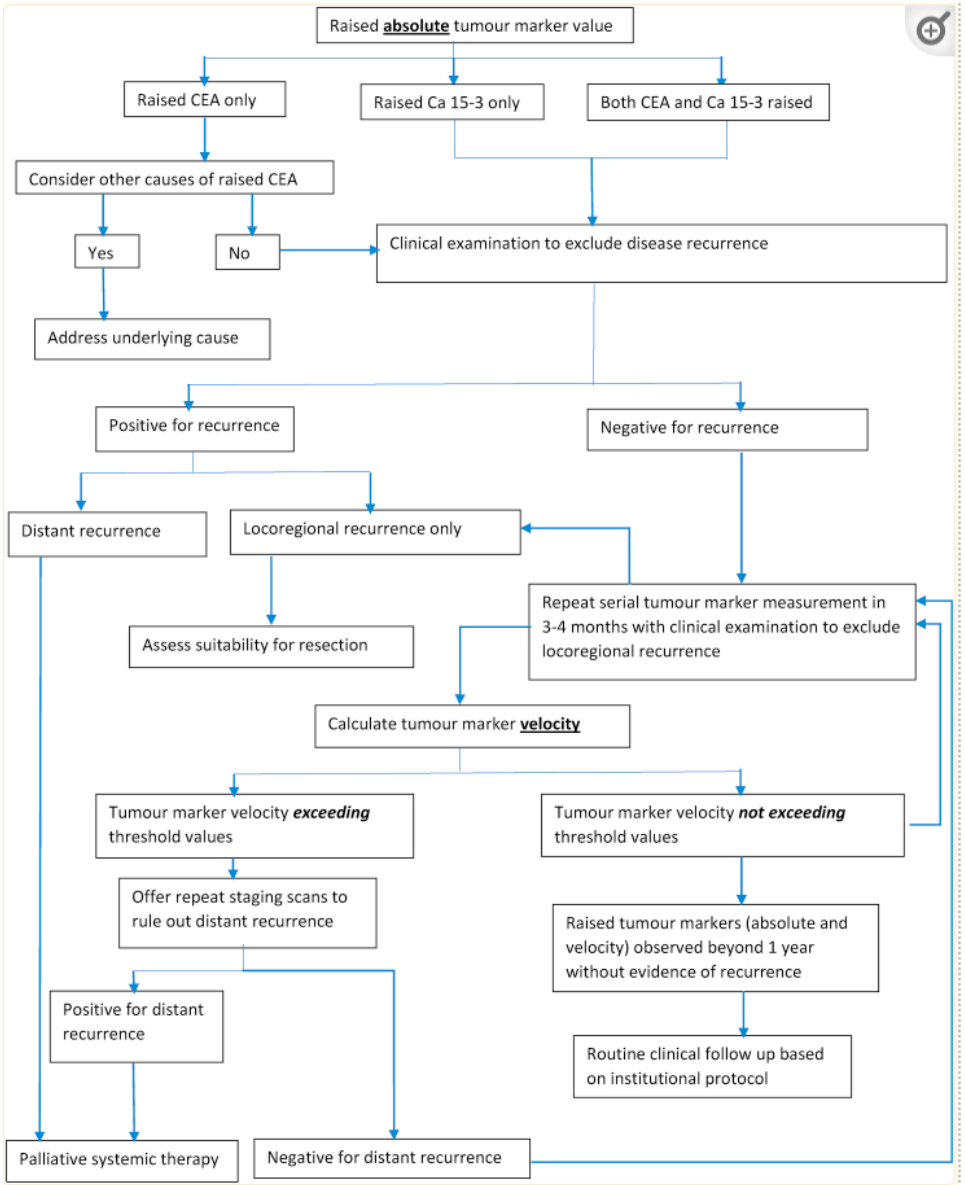
Receiver operator characteristics curve for CA 15–3 and CEA tumour marker velocity exceeding threshold values of 1.2ng/mL/year and 2.5U/mL/year respectively against tumour status, nodal status, TNM staging and NPI scores

	Recurrence		Unadjusted		Adjusted	
	No (%)	Yes (%)	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
CA 15–3 velocity						
<=2.5U/mL/year	55 (87.3)	8 (12.7)	REF	P<0.001		
>2.5U/mL/year	12 (16.9)	59 (83.1)	33.8 (12.9, 88.9)			
CEA velocity						
<=1.2ng/mL/year	57 (78.1)	16 (21.9)	REF	P<0.001		
>1.2ng/mL/year	10 (18.2)	45 (81.8)	16.0 (6.6, 38.7)			
Combined criteria either CA 15–3 or CEA velocity						
CA 15–3 ≤ 2.5 **&** CEA ≤ 1.2	49 (92.5)	4 (7.5)	REF	P < 0.001	REF	P < 0.001
CA 15–3 >2.5 **or** CEA >1.2	18 (22.2)	63 (77.8)	42.9 (13.6, 134.9)		73.4 (12.0, 448.6)	

Association between CA 15–3 velocity, CEA velocity, either CA 15–3 or CEA velocity and cancer recurrence after adjusting for tumour clinicopathological characteristics.

Vélocité des marqueurs tumoraux CA 15-3 et ACE

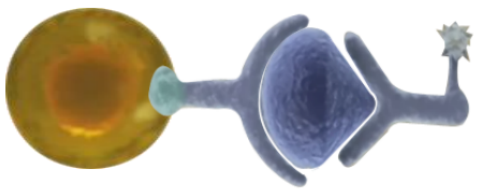
« Clinical utility of tumor marker velocity of cancer antigen 15-3 (CA 15-3) and carcinoembryonic antigen (CEA) in breast cancer surveillance », *Hing JX and al.; Breast (2020) 52:95-101*

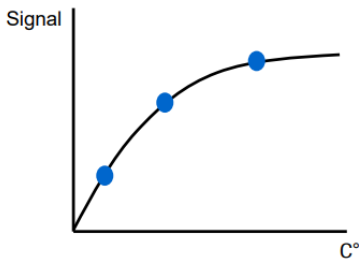


Méthodes de dosage en immuno-analyse

Electro Chimie Luminescence
Le principe sandwich

Antigène à doser + Réactifs

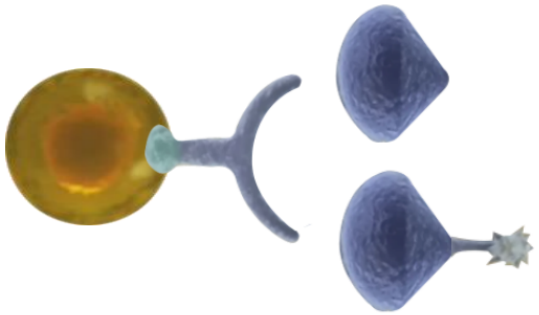


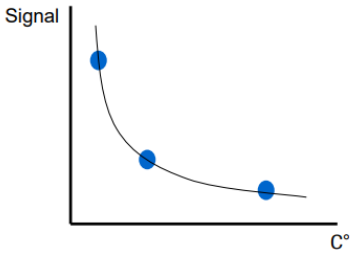


Exemple de tests dosés avec le principe sandwich:
ACTH, AFP, PCT, Ca125 II, CA 15-3 II, CA 19-9, CA 72-4, HCT, CEA, CK-MB, CMV, C-Peptide, CYFRA 21-1, FERR, PSA, HCG+b, FSH, HE4, IgE II, INSULINE, LH, MYO, NSE, PAPP-A, Pro BNP II, Prol II, PTH, TG II, P1NP, PSA, Toxo IgG, Trop, TSH

Electro Chimie Luminescence
Le principe compétition

Antigène à doser + Réactifs



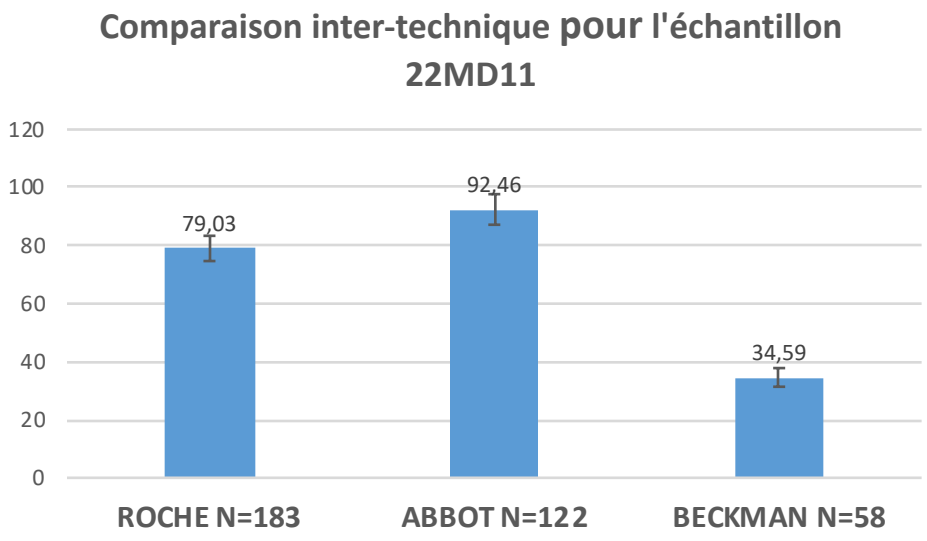


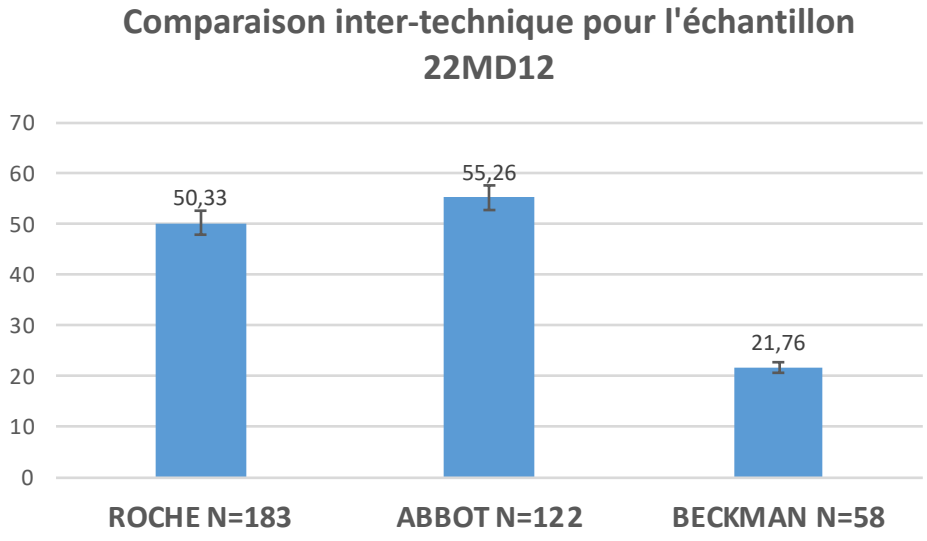
Exemple de tests dosés avec le principe compétition:
Anti-HAV, ATG, Anti-TPO, Anti-TSHR, CORT2, CSA, E2 III, FOL, RBC-FOL, FT3 III, FT4 II, PROG III, T3, T4, TESTO II, Vita B12 II

Différences inter-techniques

Résultats d'évaluation externe de la qualité (nationale)

CA 15-3





Roche/Abbot = 14,5%
Roche/Beckman = 56%
Abbot/Bekman = 62%

Roche/Abbot = 8,9%
Roche/Beckman = 57%
Abbot/Bekman = 60%

Si changement de technique = redoser les prélèvements antérieurs

Différences inter-techniques

Résultats d'évaluation externe de la qualité (nationale)

CA 15-3

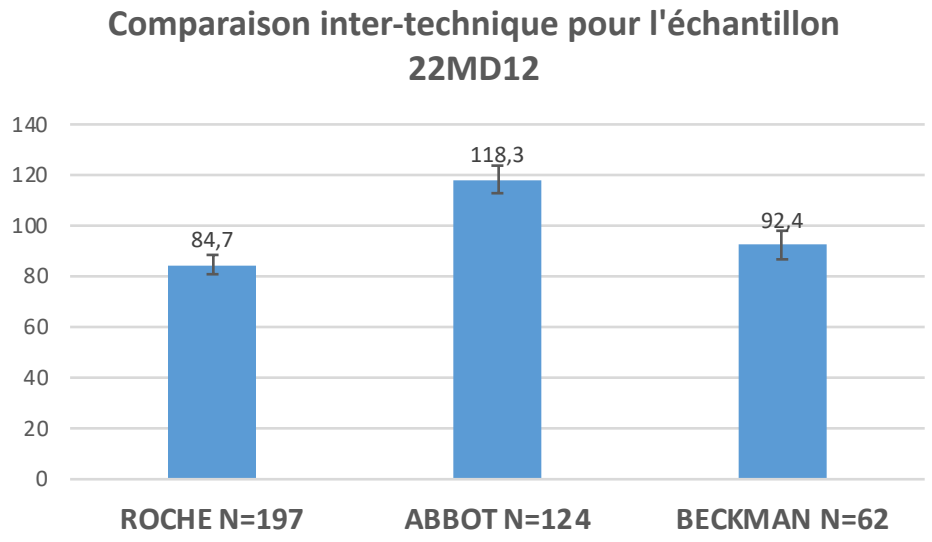
Pourquoi de telles différences ?

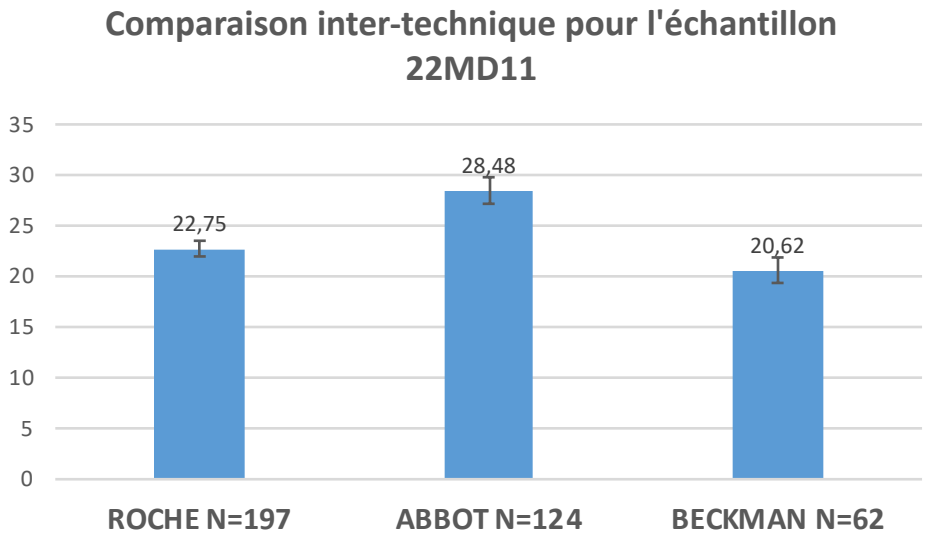
	ROCHE	ABBOTT	BECKMAN
Type analyse	immunoanalyse	immunoanalyse	immunoanalyse
Méthode	sandwich	sandwich	sandwich
Anticorps	115D8 DF3	115D8 DF3	MA552 MA695
Détection du signal	Electro-chimi-luminescence	Chimiluminescence micro-particulaire	?
Valeur de référence	< 29	< 31,3	?

Différences inter-techniques

Résultats d'évaluation externe de la qualité (nationale)

ACE





Roche/Abbot = 29%
Roche/Beckman = 8%
Abbot/Bekman = 22%

Roche/Abbot = 20%
Roche/Beckman = 9%
Abbot/Bekman = 27%

Si changement de technique = redoser l'échantillon N-1 en parallèle au minimum

Incertitudes de mesure

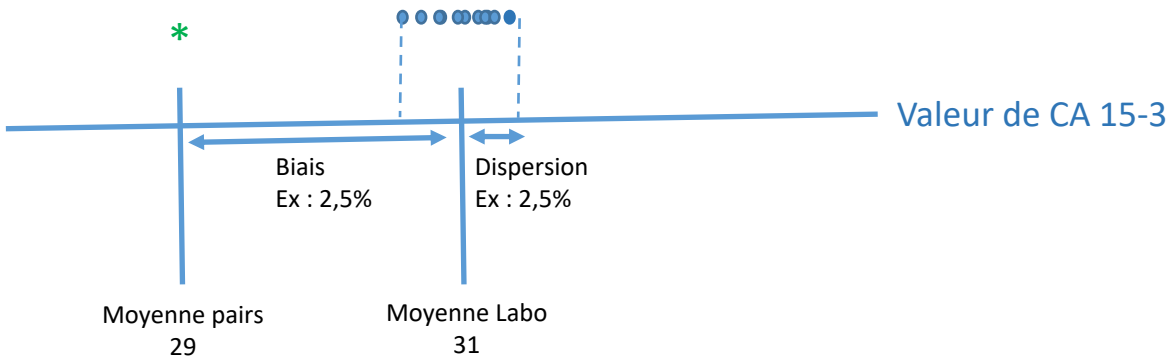
Le résultat rendu par un automate pour un dosage donné est en fait une fourchette qui doit prendre en compte les « erreurs » connues et inhérentes à chaque analyse

Exemple

Pour un échantillon donné, le laboratoire effectue plusieurs dosage successif de CA 15-3 et trouve une valeur moyenne à 31

Dispersion : répartition autours de la moyenne pour le labo (ici 2,5%)

Biais : différence par rapport à un groupe de pairs réalisant le dosage sur le même échantillon et utilisant la même technique (ici 2,5%)



Incertitude de mesure = biais + dispersion

Théoriquement, le laboratoire devrait rendre une fourchette et non un chiffre

Incertitudes de mesure de l'UBC-SLS

Technique immuno-chimiluminescence COBAS 8000 (Roche)
ACE valeur de référence : < 5,2 µg/L
CA 15-3 valeur de référence : < 29 kU/L

CA 15-3

Incertitude de mesure = 5%

Ech1 dosé à 29 UI/L → [27,5 – 30,5] kU/L

Ech2 dosé à 150 UI/L → [142,5 – 157,5] kU/L

Ech3 dosé à 136 UI/L → [129 – 143] kU/L

Pas de différence entre un dosage à 150 et à 136

ACE

Incertitude de mesure = 11% pour un taux de 2 µg/L
Incertitude de mesure = 5% pour un taux > 15 µg/L

Ech1 dosé à 5 UI/L → [4,5 – 5,5] µg/L

Ech2 dosé à 40 UI/L → [38 – 42] kU/L

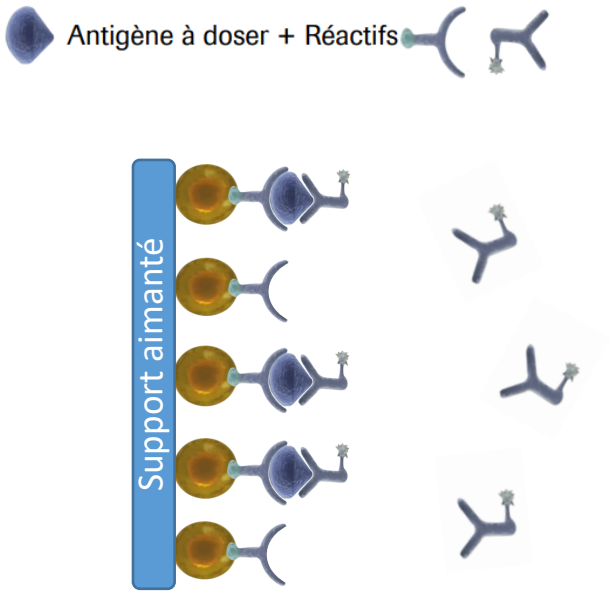
Ech3 dosé à 36 UI/L → [34 – 38] kU/L

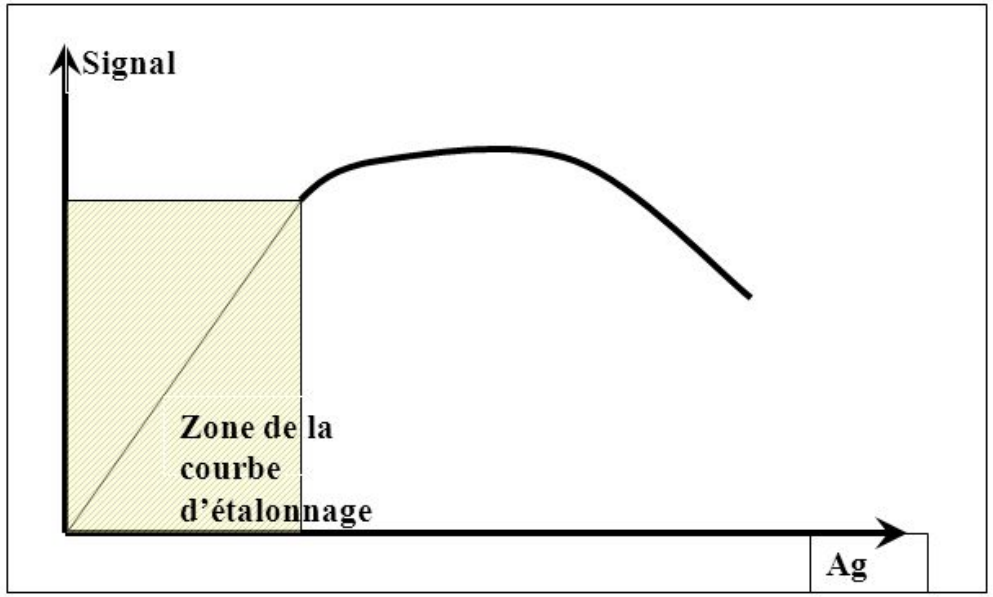
Pas de différence entre un dosage à 40 et à 36

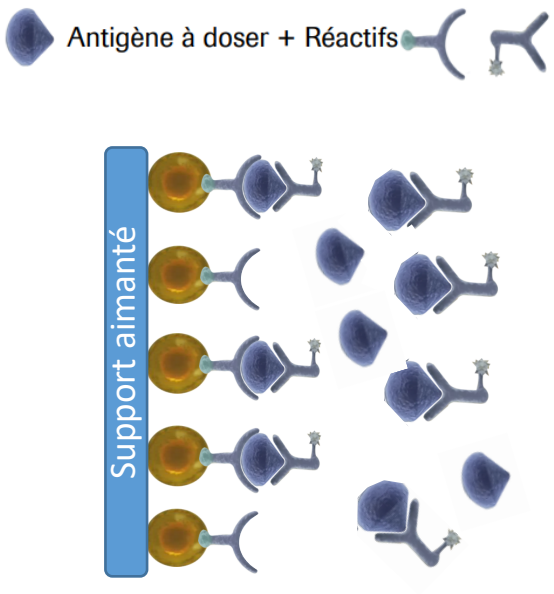
Les pièges de l'immuno-analyse

Effet crochet

Technique d'immuno-analyse sandwich







Encombrement stérique

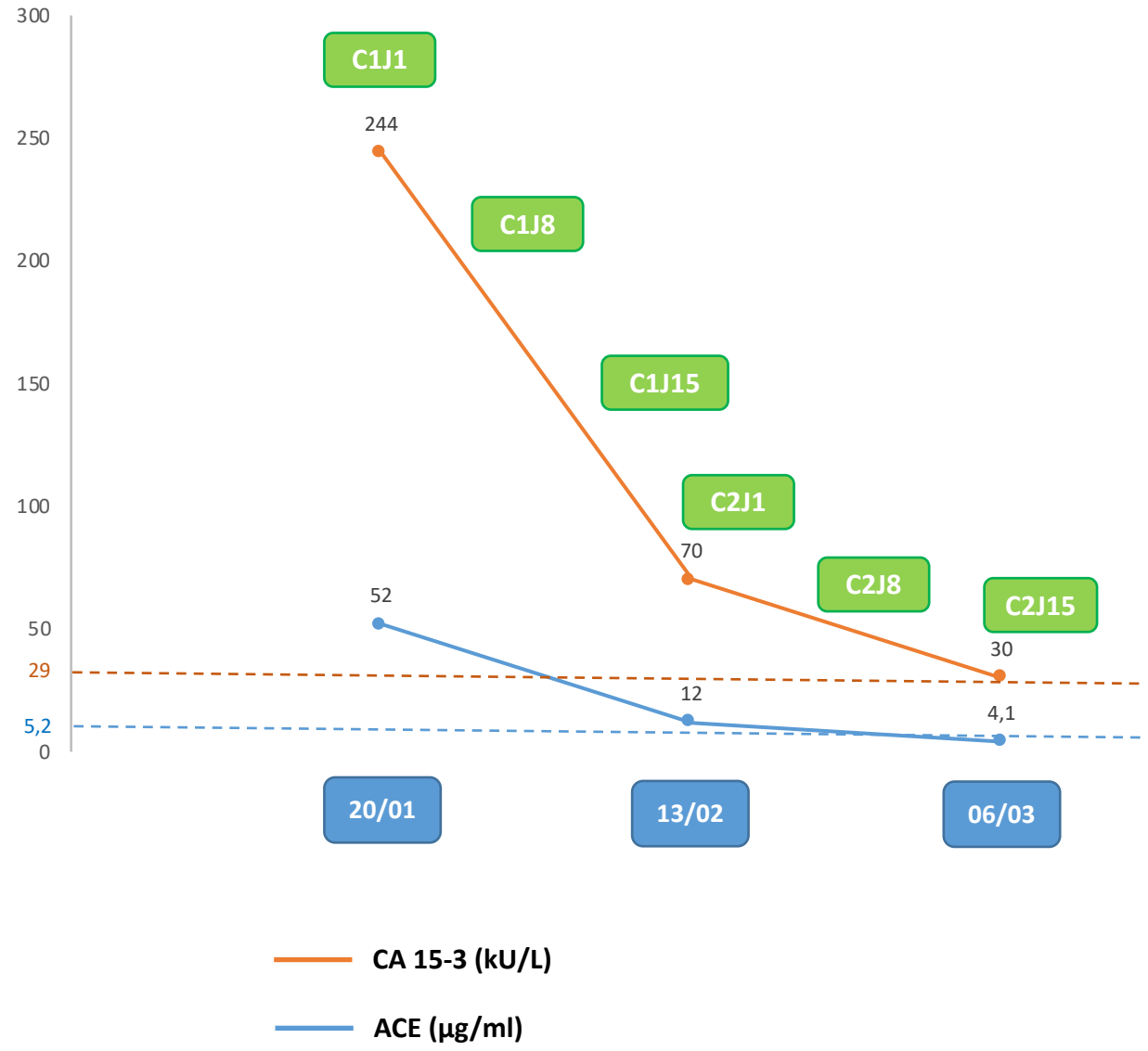
Situation normale
Le signal est proportionnel à la quantité d'antigène
Résultat OK

Technique immuno-chimiluminescence COBAS 8000 (Roche)
CA 15-3 : pas d'effet crochet jusqu'à 20 000 kU/L
ACE : pas d'effet crochet jusqu'à 200 000 µg/L

Effet crochet
Le signal décroit en présence d'un excès d'antigène
Résultat faussement bas

Exemple dossier clinique

Mme GG 51 ans



Début janvier

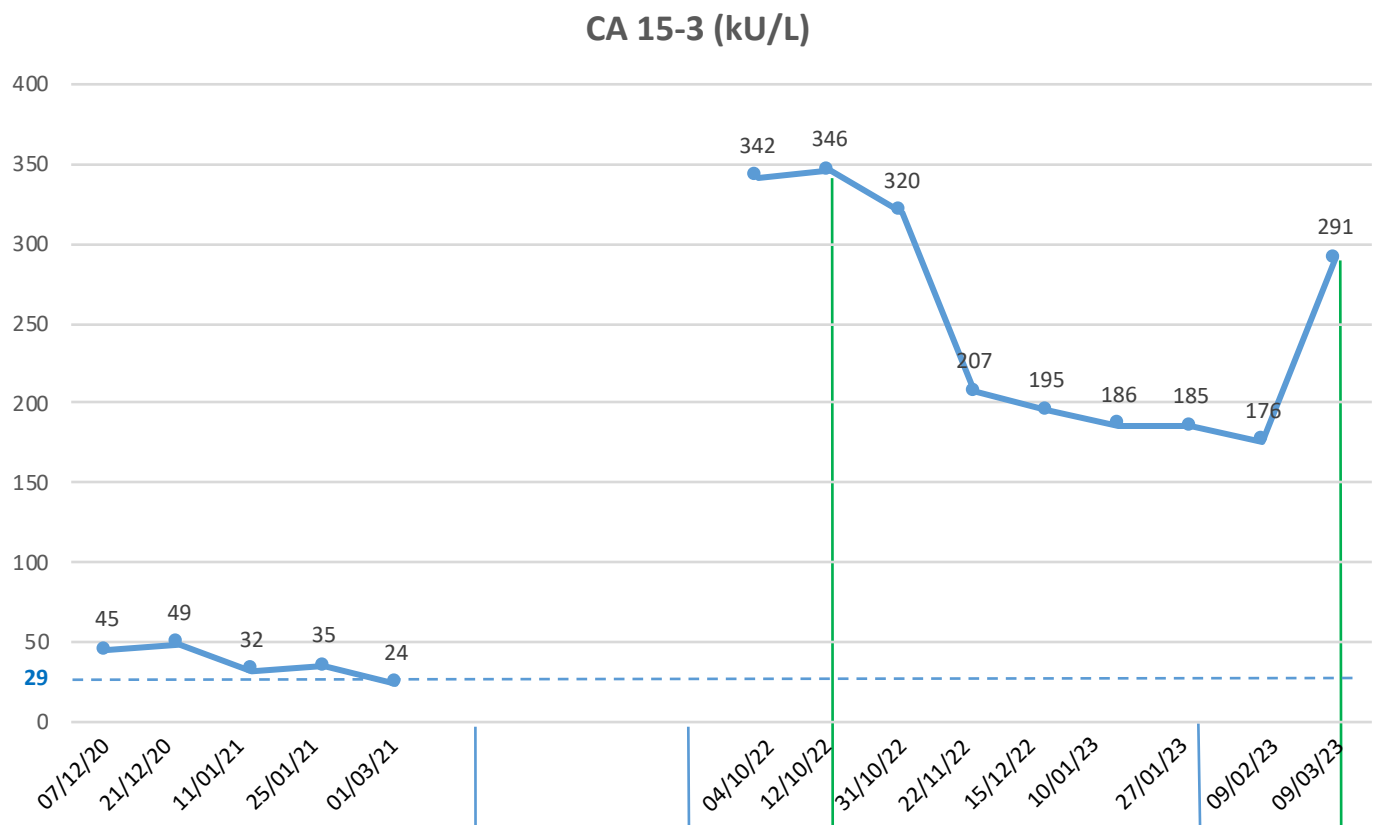
- CCI sein gauche 9 mm + 30 mm µcalcif
- Grade III RP- RO- HER+++ Ki67 40%
- CCIS haut grade
- Méta ggl sous diaphagmatique
- Méta pancréatique + hépatique
- Méta pulmonaire

20/01/23

- Début de la chimiothérapie paclitaxel + trastuzumab + pertuzumab

Exemple dossier clinique

Mme F 40 ans



09/10/20
Biopsie sein droit
CCI grade III
RE+ RP- HER2- Ki67 50%
ADP axillaire D +
T = 7 cm IRM

03/11/20 – 15/03/21
Chimio Néoadjuvante
3 cures Farmorubicine –Endoxan
12 cures Paclitaxel

Radiothérapie

01/05/20 - ? : Tamoxifène ?

14/10/22 : Protocole AMBRE : Capecitabine (5-FU)

08/04/21
Mastectomie D + curage
CCI grade III
RE+ RP- HER2- Ki67 20%
ADP : 6+/14

15/09/22
Scanner : multiples lésions hépatiques et osseuses
Biopsie : métastases

30/01/23
Scanner : réponse globale de 30% sur les lésions cibles sans apparition de nouvelles lésions

Synthèse utilisation des marqueurs tumoraux « classique »

- CA 15-3 +++ / ACE uniquement si le CA 15-3 n'est pas exprimé
- **Dépistage** : NON
- **Pré-opératoire** : valeur pronostic, valeur de référence pour le suivi
- **Post-traitement curatif** : efficacité du traitement, surveillance de récidive
- **Patientes métastatiques** : suivi de l'efficacité du traitement +++

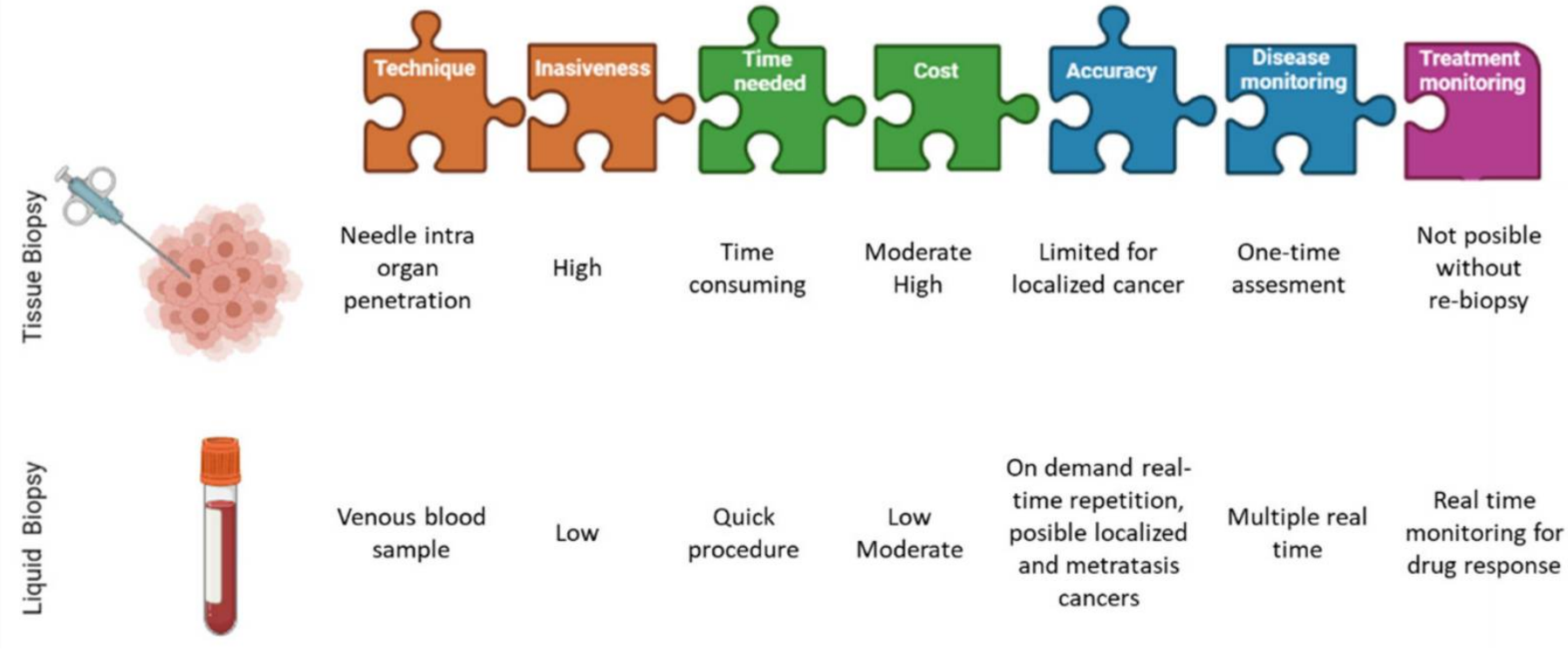
ATTENTION

Dosage toujours avec la même technique

Si changement de technique : repassage des antériorités

II- Biopsie liquide

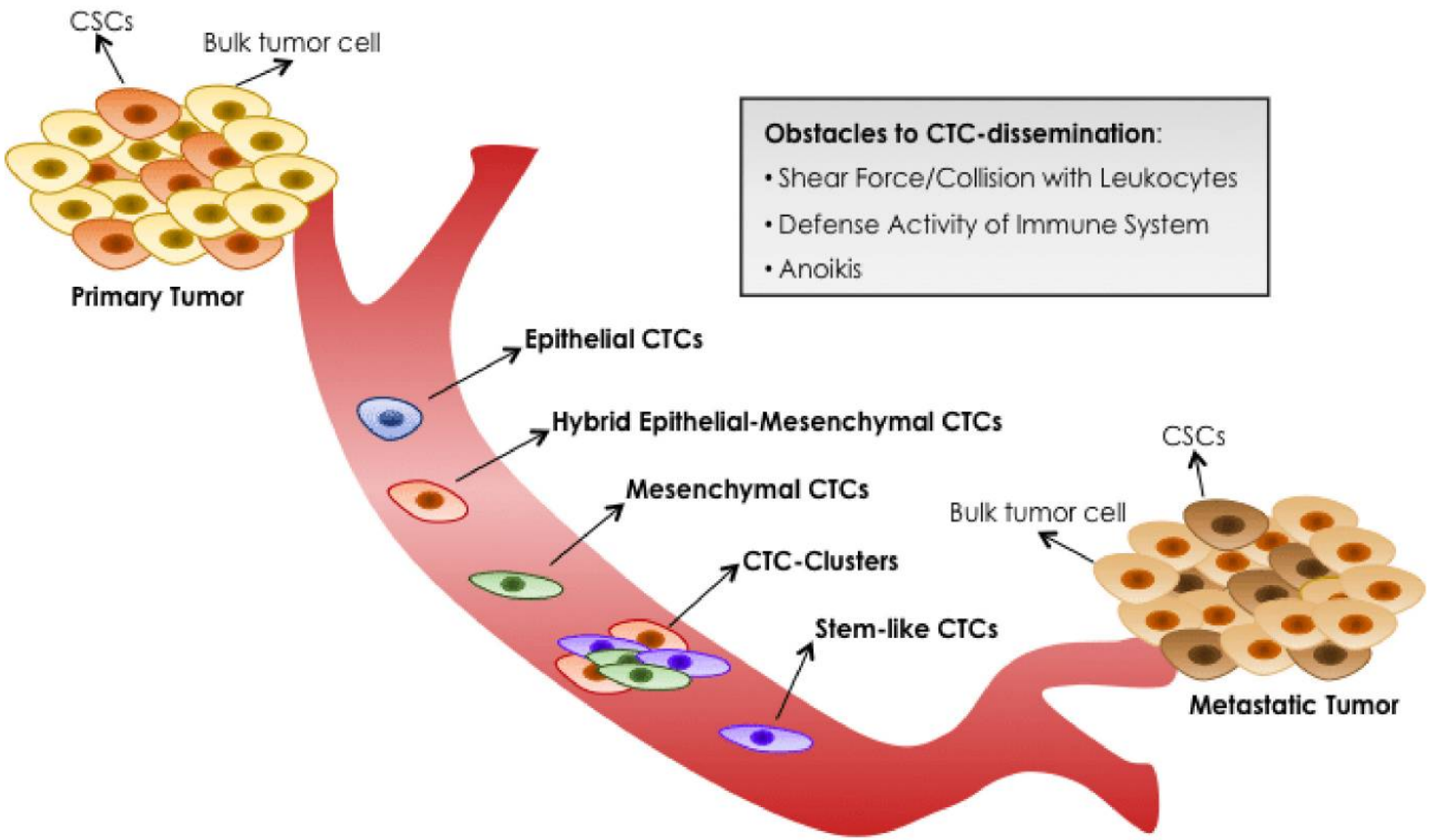
1- Cellules tumorales circulantes (CTC)
2- Circulating cell-free DNA (ccfDNA)
3- Circulating microRNA (miRNA)



	Technique	Inasiveness	Time needed	Cost	Accuracy	Disease monitoring	Treatment monitoring
Tissue Biopsy	Needle intra organ penetration	High	Time consuming	Moderate High	Limited for localized cancer	One-time assesment	Not posible without re-biopsy
Liquid Biopsy	Venous blood sample	Low	Quick procedure	Low Moderate	On demand real-time repetition, posible localized and metratasis cancers	Multiple real time	Real time monitoring for drug response

Ramos-Medina et al, Cancers, 2021

1- Biopsie liquide : Cellules tumorales circulantes (CTC)



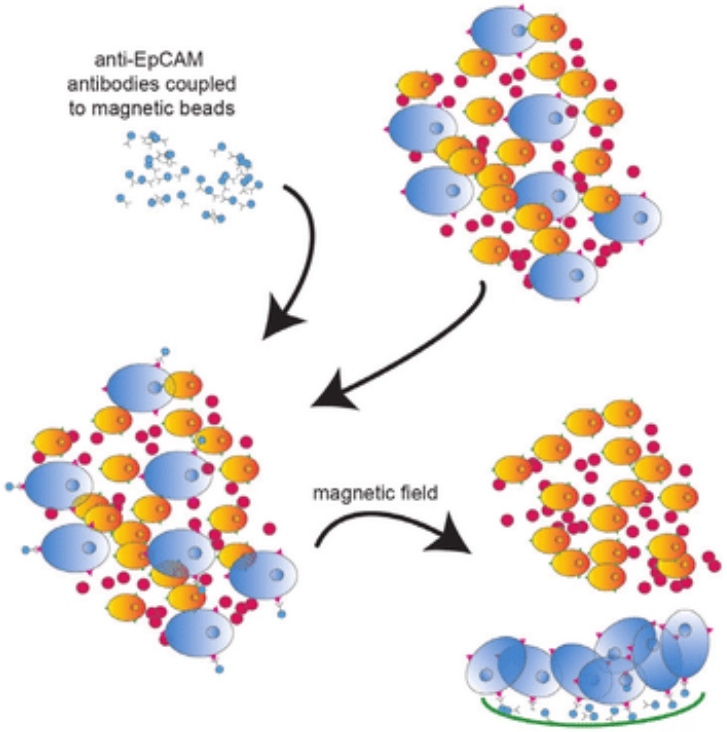
Ramos-Medina et al, Cancers, 2021

Biopsie liquide : Cellules tumorales circulantes (CTC)

Méthode de détection par marqueurs épithéliaux

Isolement des CTC

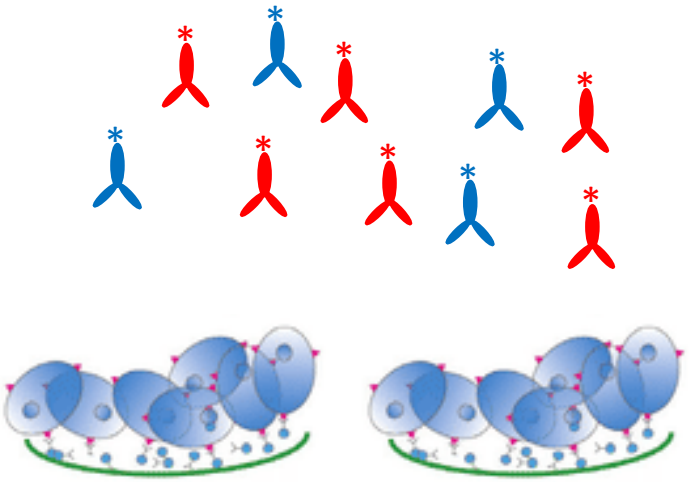
Anticorps anti-EpCAM spécifique des cellules épithéliales



Numération des CTC

Anticorps anti-CK-8-18-19 spécifiques des cellules épithéliales

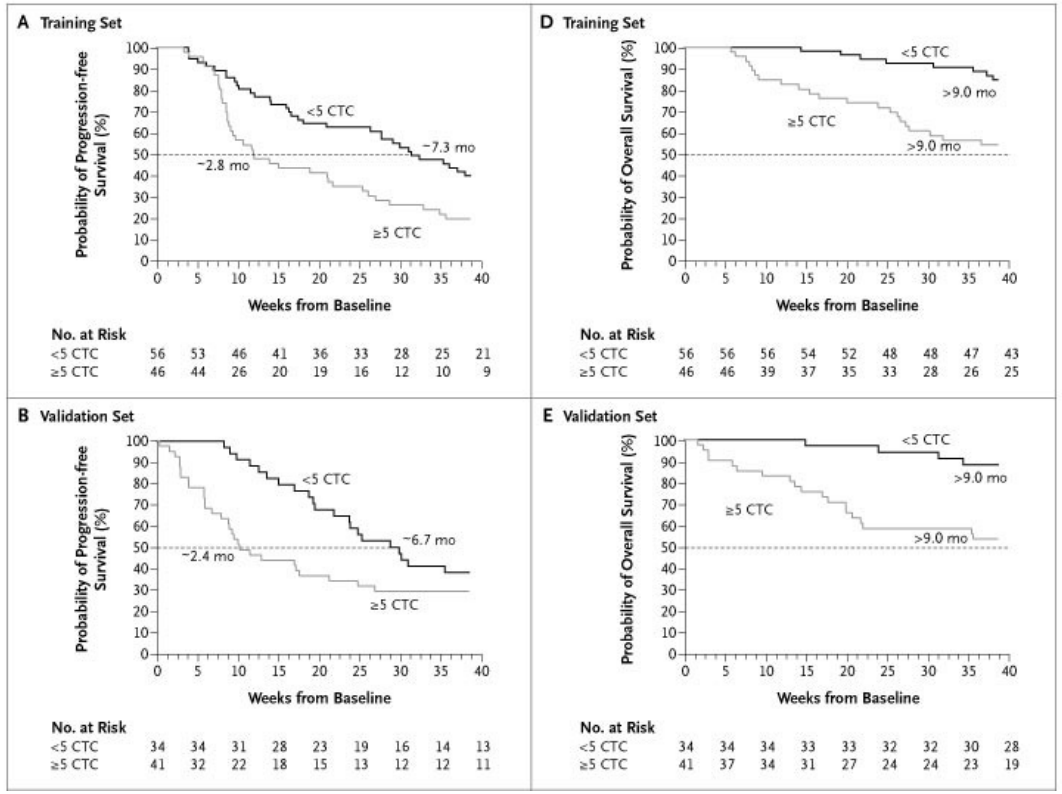
Anticorps anti-CD45 spécifiques des GB



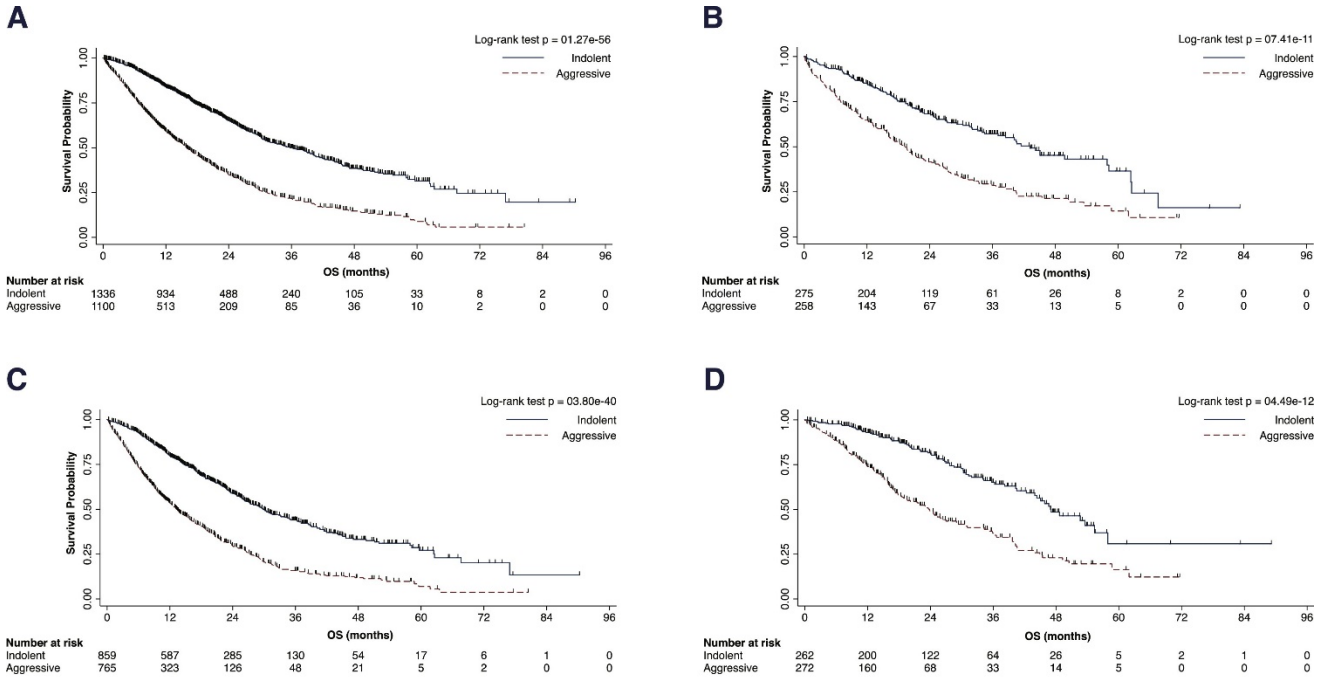
Le résultat s’exprime en nombre de CTC / 7,5 mL de sang

Biopsie liquide : Cellules tumorales circulantes

Pronostic

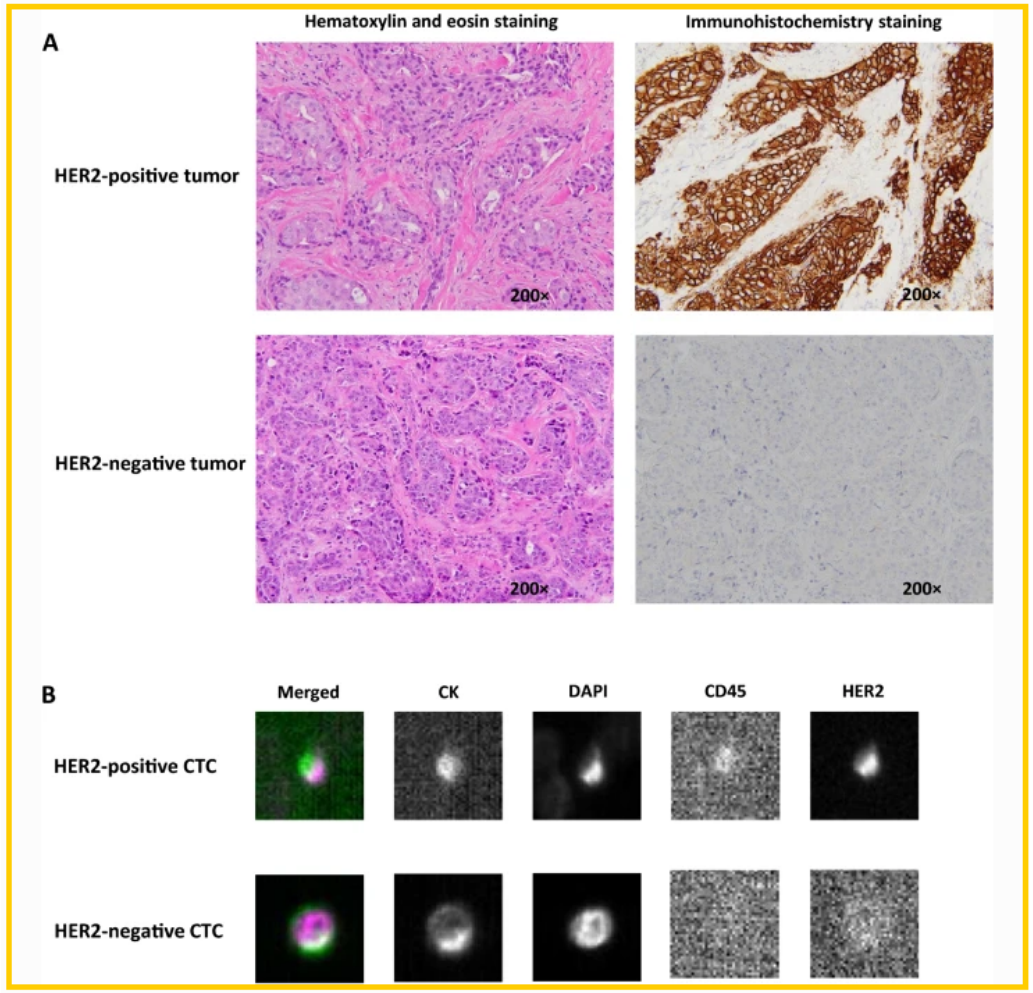


PFS et OS chez des patients atteintes de cancer du sein métastatiques
Numération des CTC avant initiation du traitement
Cristofanilli and al, New England Journal of Medicine, 2004



OS chez des patients atteintes de cancer du sein métastatiques
indolent : CTC < 5 / 7,5 ml
agressive : CTC ≥ 5 / 7,5 ml
A- Cohorte entière B- Patiente *de novo* C – Métastases viscérales D- Métastases osseuses seules
Cristofanilli and al, Critical Reviews in Oncology-Hematology, 2019

Biopsie liquide : Cellules tumorales circulantes
Statut HER2

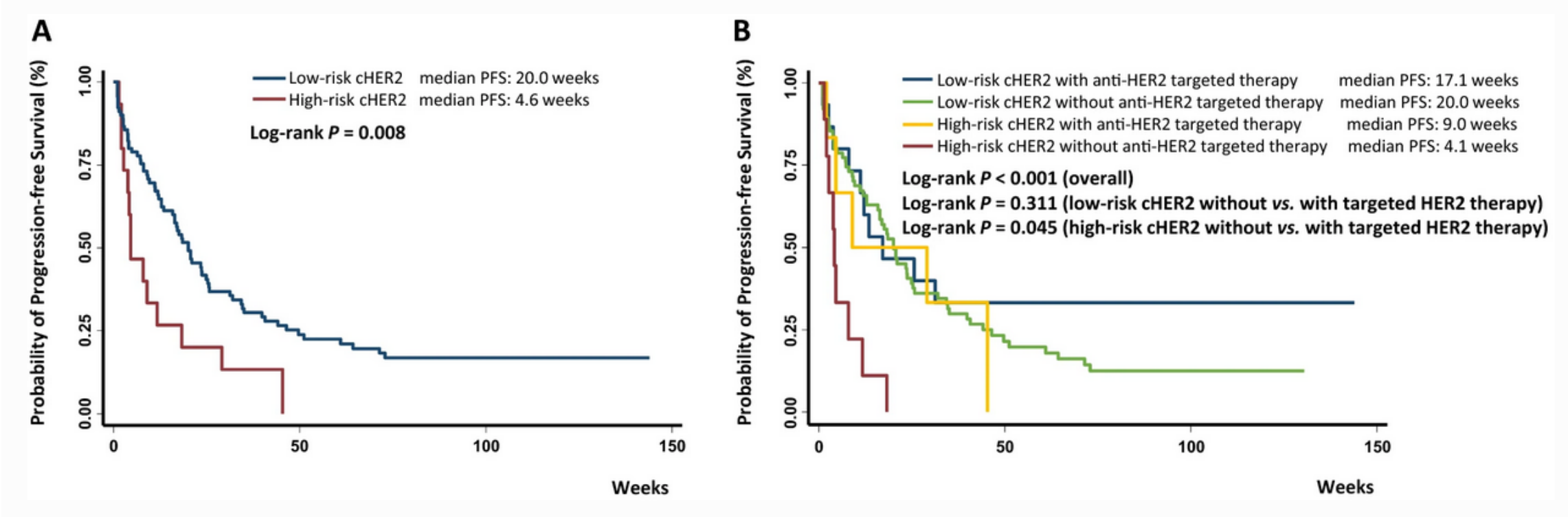


Détermination du statut HER par marquage des CTC
Possible discordance tumeur primaire / CTC
15 / 105 patients cHER2+ (≥ 2 CTC HER2+) avec tumeur primaire HER2-

Wang and al, Breast Cancer research and treatment, 2020

Biopsies liquides : Cellules tumorales circulantes

Statut HER2



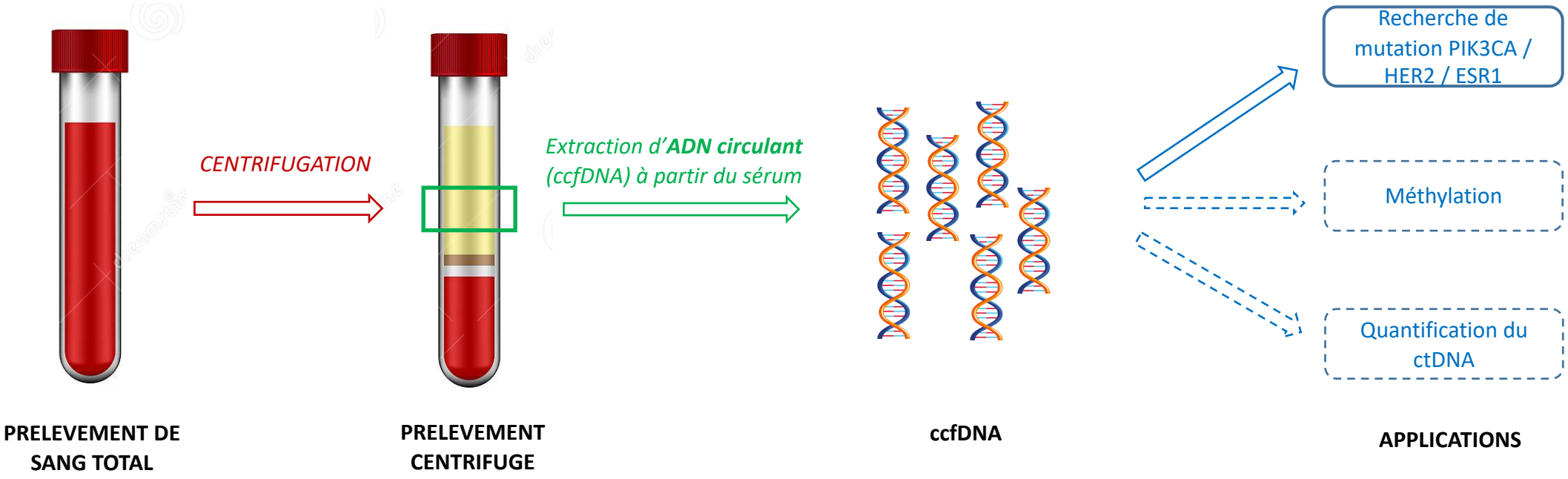
cHER2 high risk : ≥ 2 CTC HER2+
cHER2 low risk : < 2 CTC HER2+

Le traitement par anti-HER2 chez les patients CTC HER2+ améliore la PFS

Wang and al, Breast Cancer research and treatment, 2020

2- Biopsie liquide : Circulating cell-free DNA (ccfDNA)

ccfDNA = ccf non-tumoral DNA + circulating tumoral DNA (ctDNA)



Biopsie liquide : recherche de mutation sur ccfDNA

PIK3CA

E542K / E545K
H1047R / H1047L

NCCN /FDA
Recherche de mutation PIK3CA dans du tissu tumoral ou ccfDNA dans les cancers du sein métastatiques RH+ HER2-

Thérapie ciblée
Alpelisib
Inhibiteur oral de la PI3Ka

ESR1

codons 380, 536, 537, 538 = mutations de résistances aux inhibiteurs de l'aromatase

Indication
Cancer du sein métastatiques RH+ HER2- traité par anti-aromatase

Thérapie
Switch = fulvestrant

Essai clinique PADA-1
Bidard FC. and al, Lancet Oncology, 2022

HER2

Amplification
Mutation

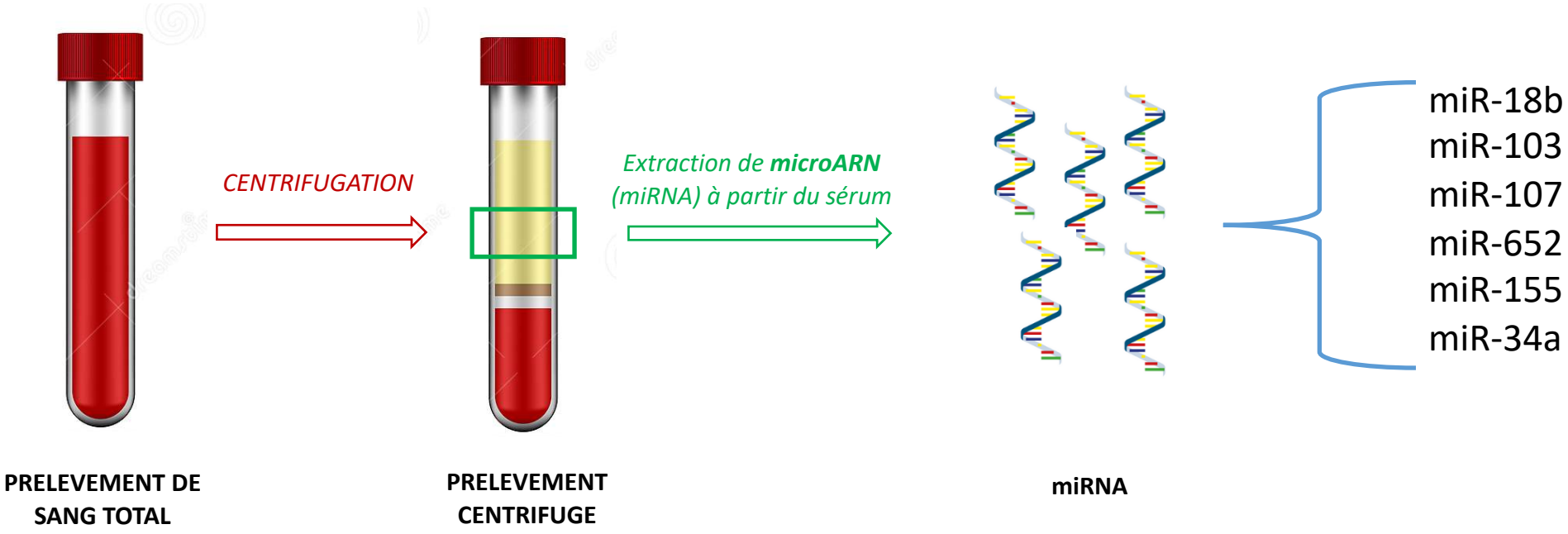
Indication
Cancer du sein métastatique

Thérapie
Anti-HER2

Turner NC. and al, Lancet Oncology, 2020

Biopsie liquide : miRNA

ARN non codant circulant de petites tailles



En développement

Bibliographie

« Circulating biomarkers in breast cancer », Seale KN and al, Clinical Breast Cancer, 2022

« CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer », Duffy MJ and al, Clinica Chimica Acta, 2010

« Intérêt des marqueurs tumoraux : quelle place pour l'ACE et le CA 15-3 ? » Riedinger JM, Médecine Nucléaire, 2010

« Clinical utility of tumour marker velocity of cancer antigen 15-3 and carcinoembryonic antigen in breast cancer surveillance », Hing JX and al, The Breast, 2020

« Current immunoassay methods and their applications to clinically used biomarkers of breast cancer », Jeong S ans al, Clinical Biochemistry, 2020

« Tumor markers of breast cancer: new prospectives », Kabel AM, 2017

« Circulating tumor cells in breast cancer », Bidard FC and al, Molecular Oncology, 2016

« The evolving role of circulating tumor cells in the personalized management of breast cancer: from enumeration to molecular characterization », Sarangi S and al, Current breast Cancer Report, 2014