

Atelier

Recommandations pour analyser et interpréter les résultats sur ADNtc

Marc Denis et Pierre-Jean Lamy

Avec le soutien du



Groupe Français de
Cytogénomique Oncologique



Liens d'intérêt

Pierre-Jean Lamy : Biorad, Roche, AstraZeneca

Marc Denis : Qiagen, Roche Pharma, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim



PLAN

- 1. Tour de table sur la pratique actuelle**
- 2. Les prescriptions dans la CBNPC**
- 3. Quelles modalités pré-analytiques ?**
 1. Les tubes de prélèvement
 2. La centrifugation
 3. Le volume de plasma à utiliser
- 4. Quelles modalités analytiques?**
 1. L'analyte
 2. La limite de détection (LOD)
 3. Les qPCR
 4. Les PCR numériques
 5. Le NGS
- 5. Contrôles qualités externes**
- 6. Post analytique**



Tour de table

Mise en routinede l'auditoire

Principales indications :

- CBNPC (EGFR, BRAF)
- CRC (RAS)
- Mélanome (BRAF, NRAS)
- Sein (ESR1, PIK3CA)
- Autres :



ADN tumoral circulant

Prescriptions dans le CBNPC

- **ACCORD / DESACCORD**

Affirmations

L'ADNtc peut être utilisé pour :

- Evaluer le pronostic du patient
- Rechercher des mutations au diagnostic en l'absence de prélèvement tissulaire
- Evaluer La réponse au traitement
- Détecter la maladie résiduelle
- Mettre en évidence les mutations de résistance (T790M)



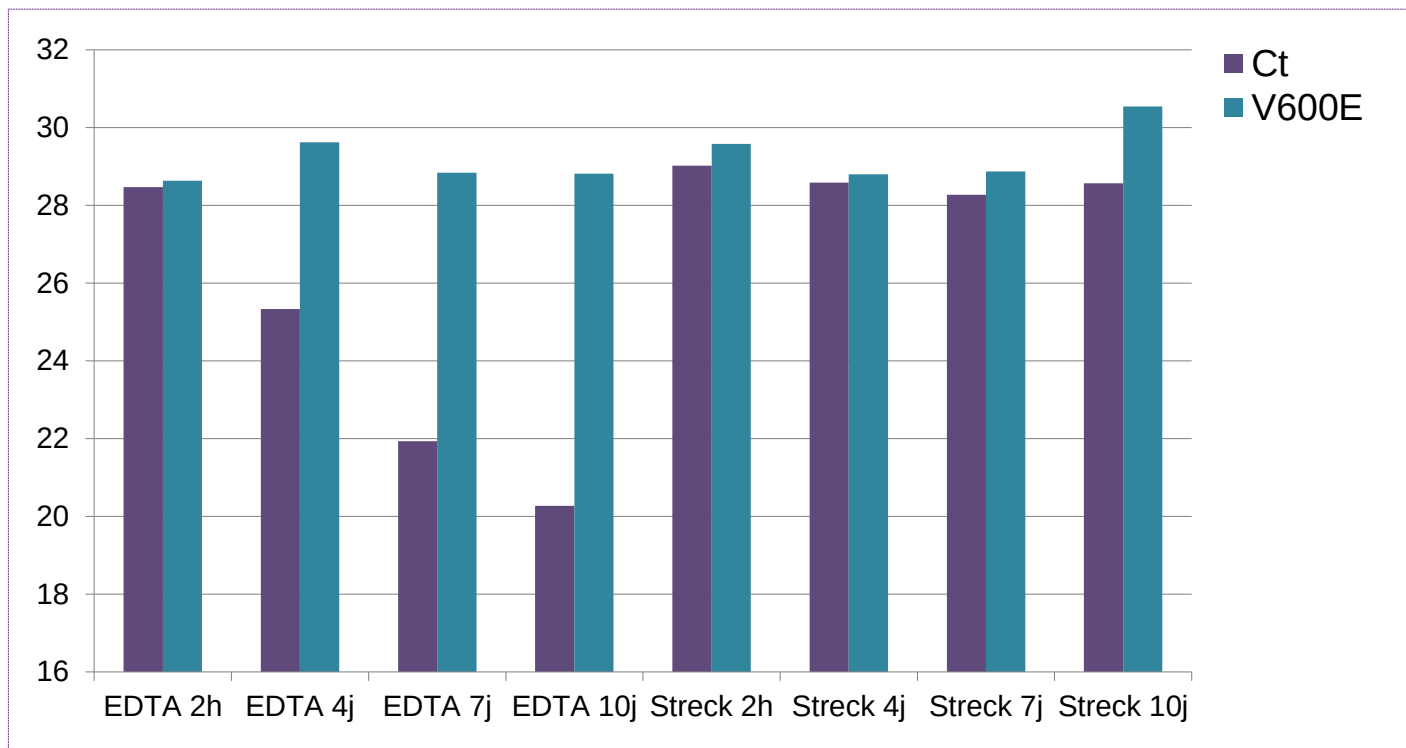
ADN tumoral circulant

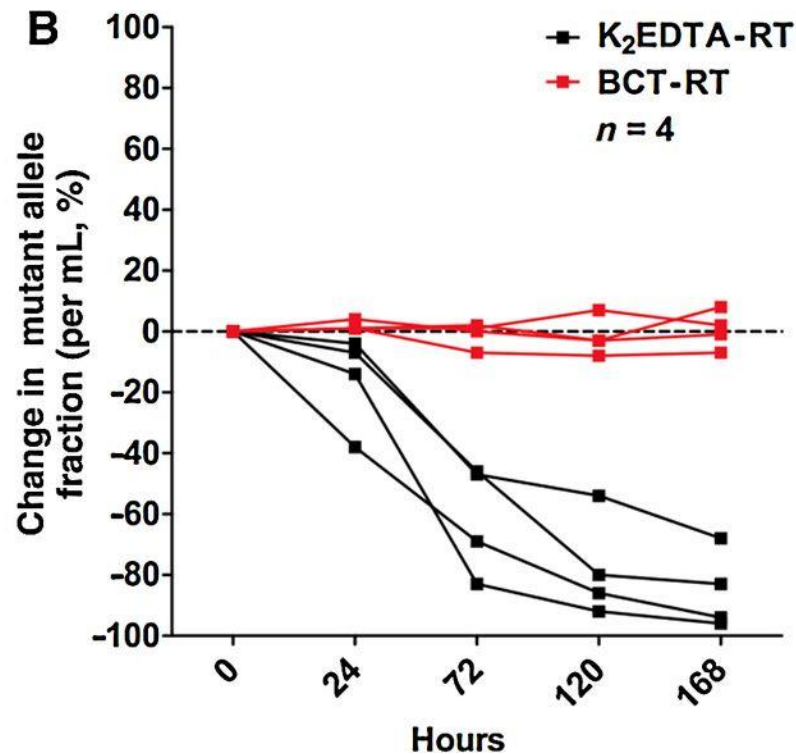
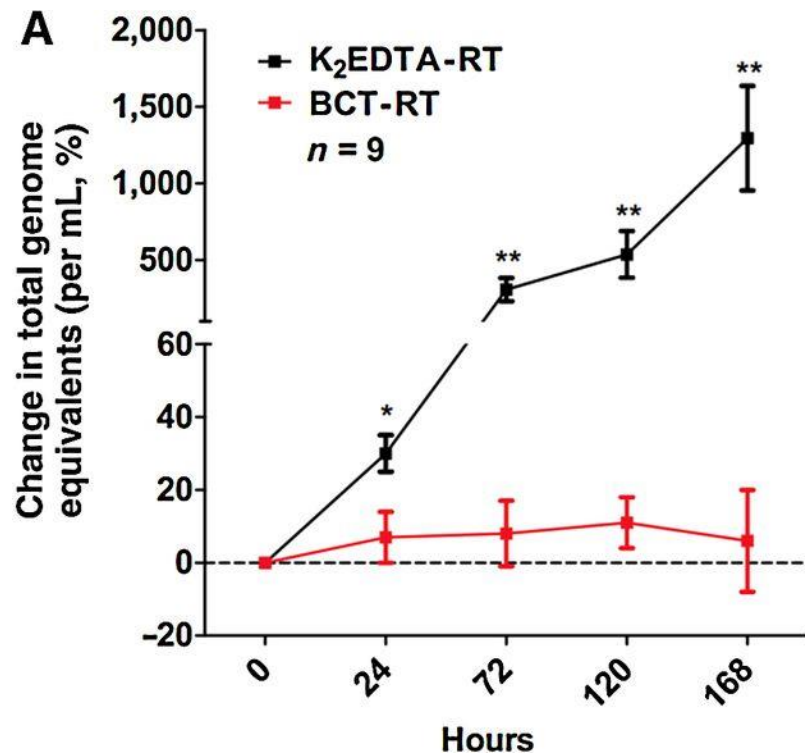
Modalités pré-analytiques (tubes)

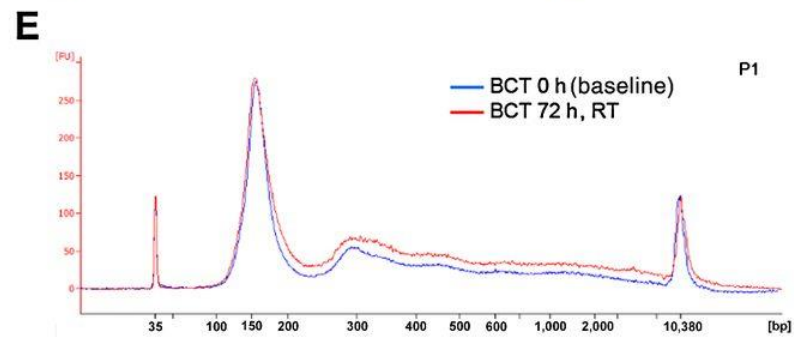
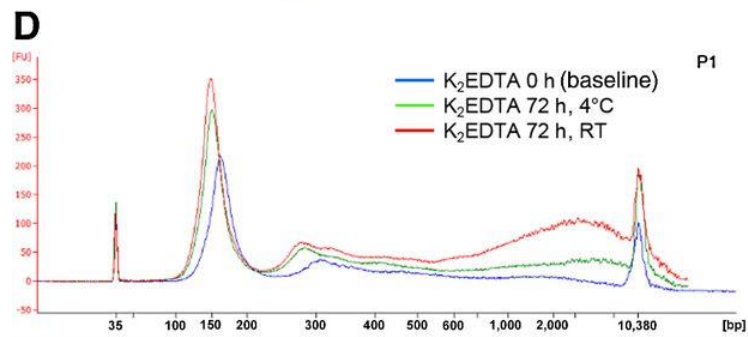
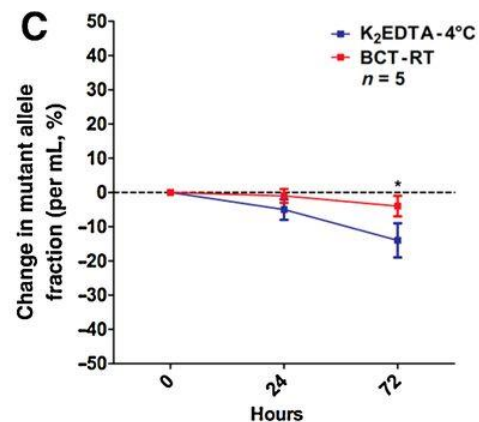
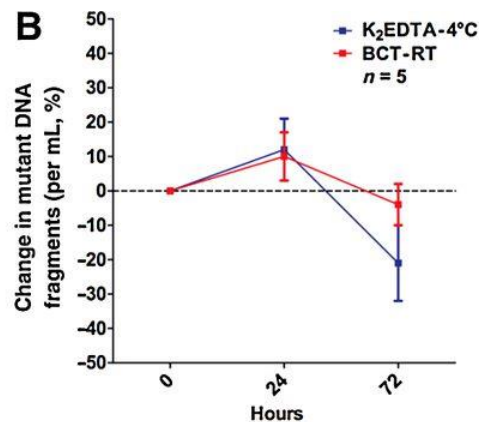
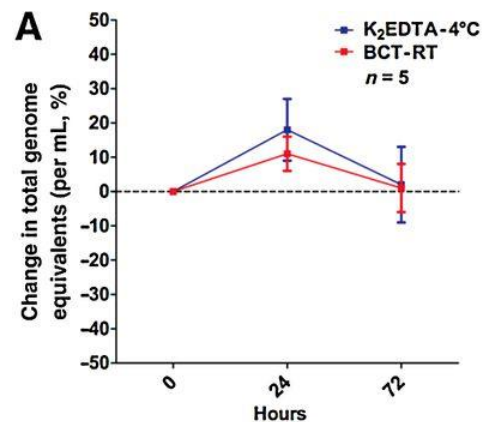
Affirmations

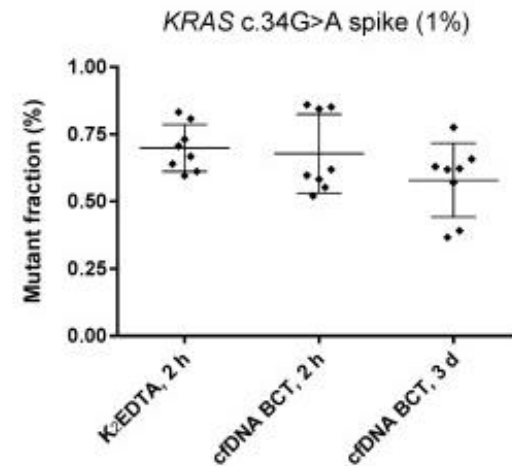
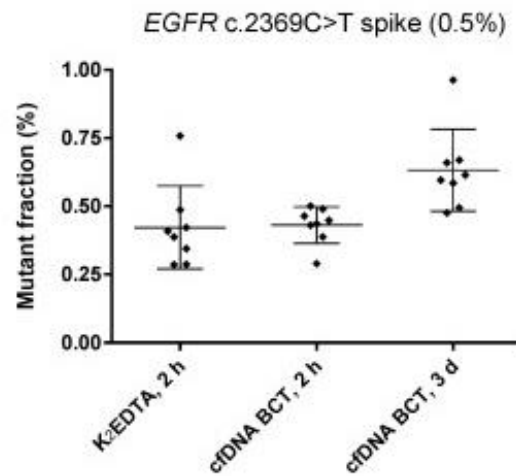
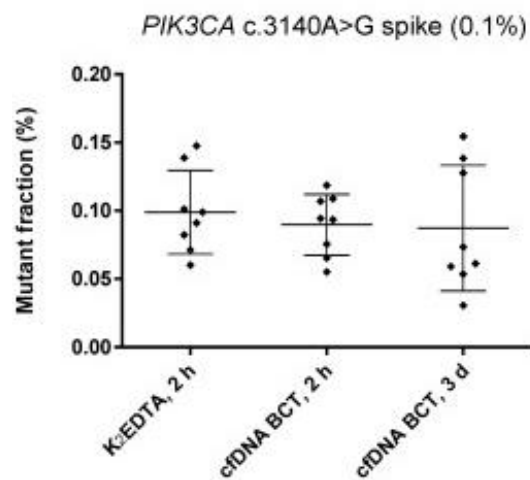
- Le sérum ne doit pas être utilisé
- Le plasma EDTA peut être utilisé
- Les tubes EDTA doivent être centrifugés dans les 3-4h après le prélèvement
- Les tubes BCT (Streck) permettent une prise en charge dans les 10 jours
- L'utilisation des tubes cfDNA Roche a été validée avec des prélèvements de patients ayant un CBNPC
- Il existe d'autres tubes validés pour l'analyse de l'ADNtc

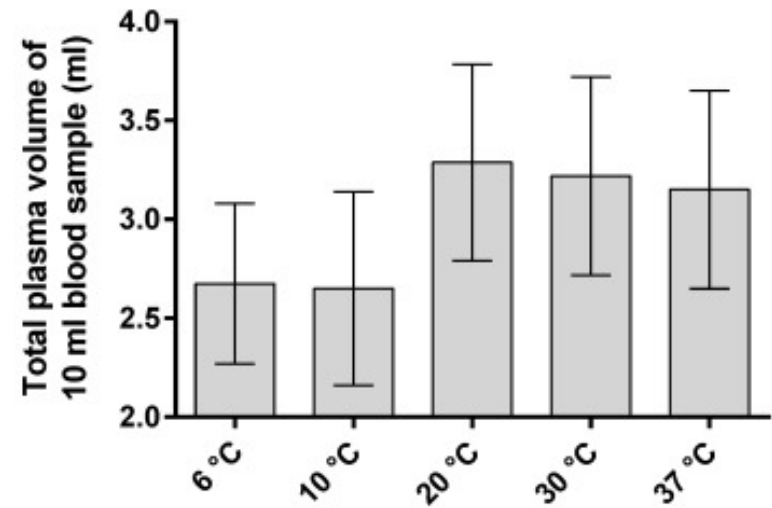
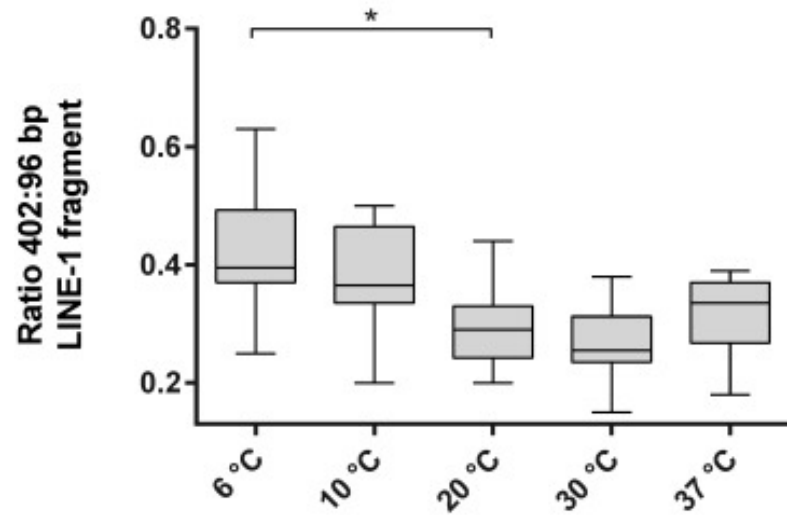
- **ACCORD / DESACCORD**













ADN tumoral circulant

Modalités pré-analytiques (tubes)

Affirmations

- Le sérum ne doit pas être utilisé
- Le plasma EDTA peut être utilisé
- Les tubes EDTA doivent être centrifugés dans les 3-4h après le prélèvement
- Les tubes BCT (Streck) permettent une prise en charge dans les 10 jours
- **L'utilisation des tubes cfDNA Roche a été validée avec des prélèvements de patients ayant un CBNPC**
- **Il existe d'autres tubes validés pour l'analyse de l'ADNtc**

- **ACCORD / DESACCORD**

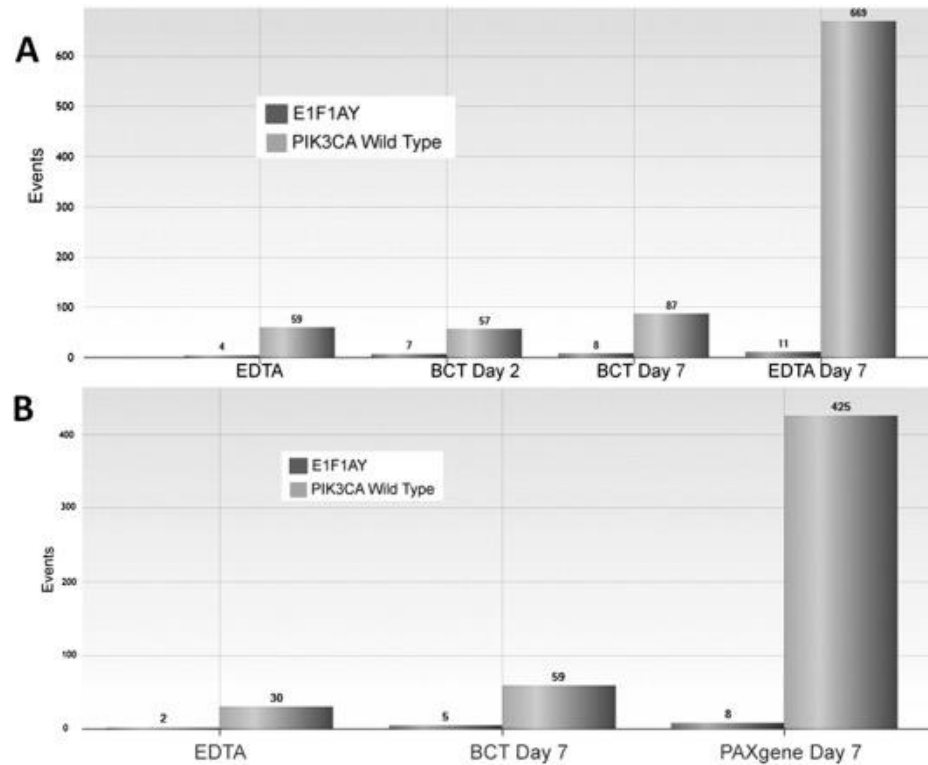


Table 2

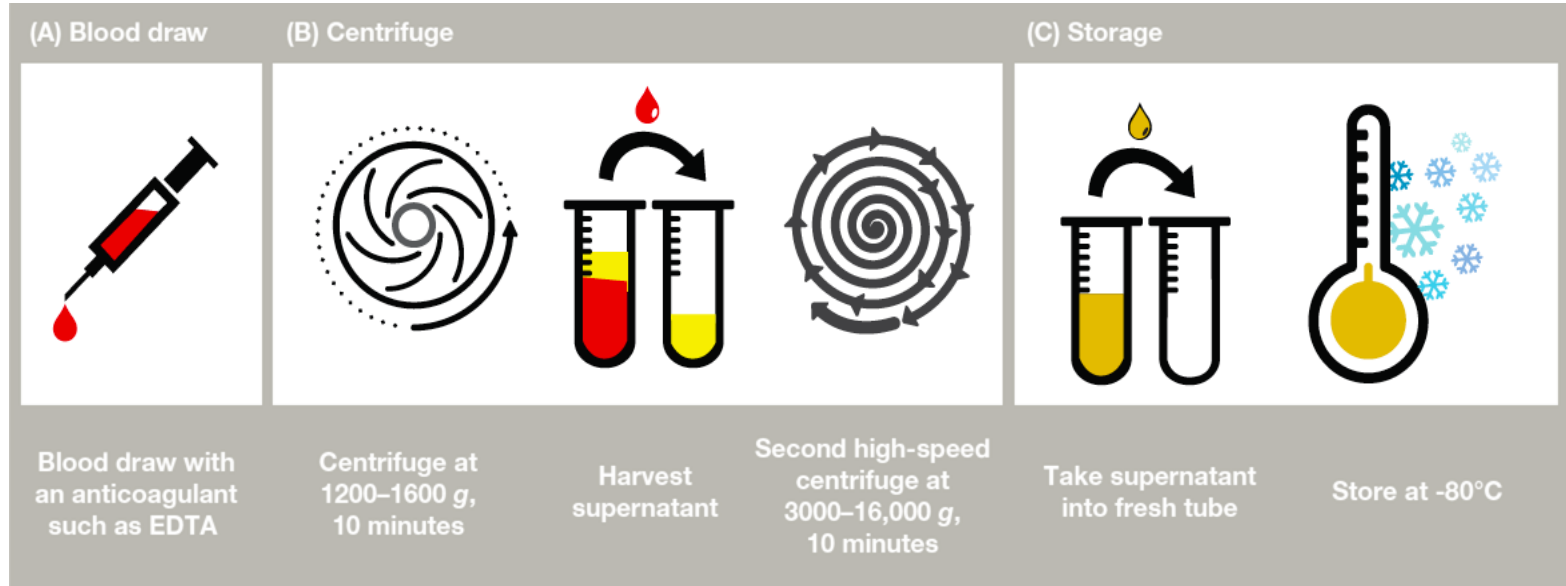
Statistical comparison of average genome equivalents for patients' plasma DNA in various collection tubes and time points.

Exon 9					
Tube	EDTA day 1	BCT day 1	PAXgene day 1	BCT day 7	PAXgene day 7
Mean	294.89	305.00	244.78	297.33	4442.89
SD	305.74	355.01	270.85	303.81	5243.78
SEM	101.91	118.34	90.28	101.27	1747.93
n	9	9	9	9	9
Exon 9					
	EDTA vs BCT day 1	EDTA vs PAXgene day 1	BCT day 1 vs BCT day 7	PAXgene day 1 vs PAXgene day 7	
p-Value	0.78	0.09	0.87	0.04	
Exon 20					
Tube	EDTA day 1	BCT day 1	PAXgene day 1	BCT day 7	PAXgene day 7
Mean	127.78	136.00	134.67	151.11	3248.44
SD	114.55	175.55	165.44	188.40	2857.19
SEM	38.18	58.52	55.15	62.80	952.40
n	9	9	9	9	9
Exon 20					
	EDTA vs BCT day 1	EDTA vs PAXgene day 1	BCT day 1 vs BCT day 7	PAXgene day 1 vs PAXgene day 7	
p-Value	0.77	0.76	0.32	0.01	

- **ACCORD / DESACCORD**

Affirmations

- Le plasma est récupéré après 2 centrifugations : basse vitesse puis haute vitesse
- Le plasma peut être conservé à -20°C pendant 1 semaine, ensuite à -80°C



Can be performed
either before or after
freeze / thaw

- **ACCORD / DESACCORD**

Affirmations

- **Toutes les techniques d'extraction sont équivalentes**
- L'extraction doit se faire à partir d'un minimum de 2 ml de plasma
- Il a été montré qu'augmenter le volume de plasma extrait augmentait la concordance avec les tests tissulaires (PPA)

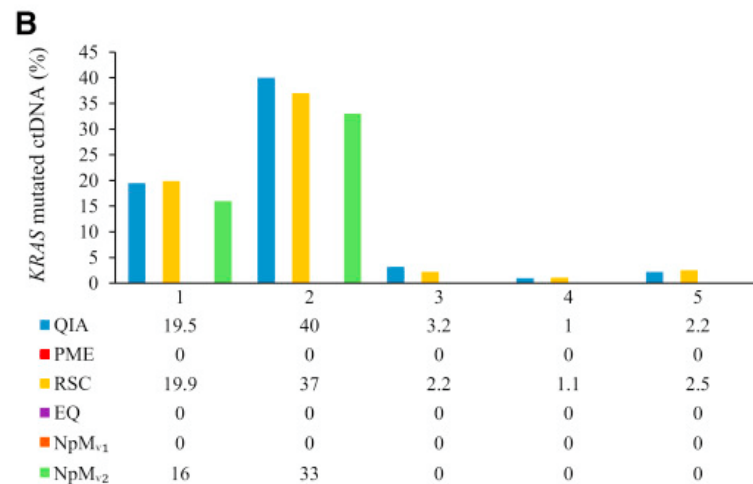
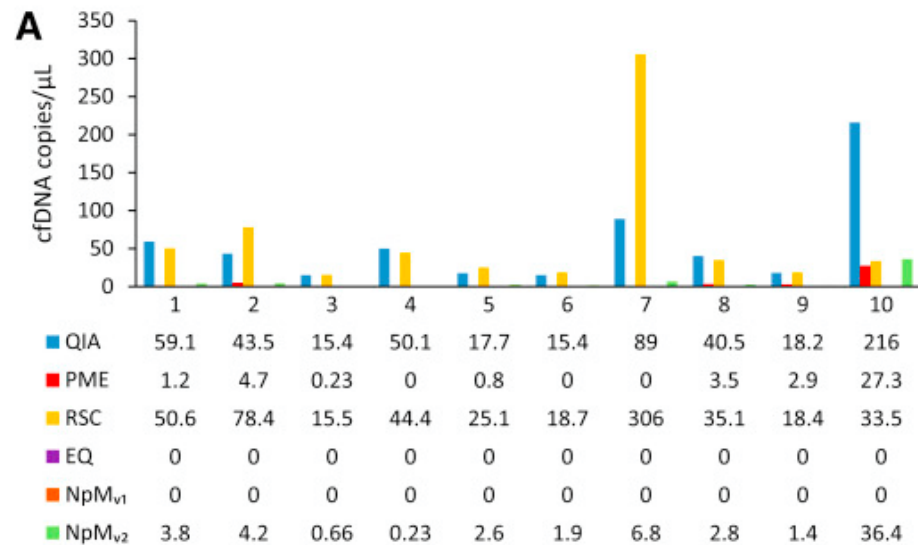
n	Maxwell RSC	QIAmp	MagnaPure Compact
33	1,25 ng/ μ L	1,08 ng/ μ L	
26	2,31 ng/ μ L		1,15 ng/ μ L

Sample ID	Gene	Mutation	MR [‡]		MPC [§]	
			MAF (%)	CI (%)	MAF (%)	CI (%)
MAC-52	<i>EGFR</i>	del 19	0.22	0.106–0.486	0.313	0.121–0.807
MMM-96	<i>EGFR</i>	del 19	22.093	20.456–23.836	24.404	21.803–27.286
JMF-86	<i>EGFR</i>	G719X	7.201	4.649–11.151	6.777	4.497–6.129
CRE-36	<i>EGFR</i>	L858R	39.005	36.547–41.527	38.974	36.493–41.585
MMM-97	<i>EGFR</i>	T790M	1.031	0.773–1.37	1.016	0.63–1.634
JMF-87	<i>EGFR</i>	T790M	4.516	2.378–8.566	3.659	1.397–9.564

Overview of cfDNA Isolation Kits

Kit	Method	Lysis step before cfDNA capture	Protocol
QIA	Silica-based column	Yes	Manual
PME	Polymer-mediated enrichment	No	Manual
RSC	Magnetic beads	Yes	Automatic
EQ	Magnetic beads	No	Manual
NpM _{V1} /NpM _{V2}	Magnetic beads	Yes	Manual

cfDNA, cell-free DNA; EQ, EpiQuick Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit (EpiGentek, Farmingdale, NY); NpM_{V1}, NEXTprep-Mag cfDNA Isolation Kit (SanBio B.V., Uden, the Netherlands); NpM_{V2}, second, consecutive version of the NpM kit (SanBio B.V.); PME, PME free-circulating DNA Extraction Kit (Westburg, Leusden, the Netherlands); QIA, QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen); RSC, Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega, Leiden, the Netherlands).



- **ACCORD / DESACCORD**

Affirmations

- Toutes les techniques d'extraction sont équivalentes
- L'extraction doit se faire à partir d'un minimum de 2 ml de plasma
- Il a été montré qu'augmenter le volume de plasma extrait augmentait la concordance avec les tests tissulaires (PPA)



PLAN

1. Tour de table sur la pratique actuelle
2. Les prescriptions dans la CBNPC
3. Quelles modalités pré-analytiques ?

1. Les tubes de prélèvement
2. La centrifugation
3. Le volume de plasma à utiliser

4. Quelles modalités analytiques?

1. L'analyte
2. La limite de détection (LOD)
3. Les qPCR
4. Les PCR numériques
5. Le NGS

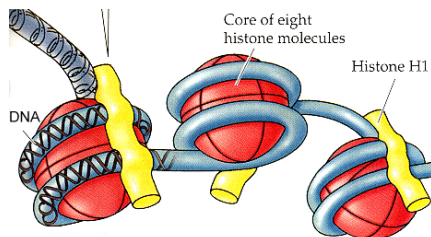
5. Contrôles qualités externes

6. Post analytique

ADN tumoral circulant

Quelles modalités analytiques des tests : l'analyte

- Taille de l'ADN tumoral libre circulant

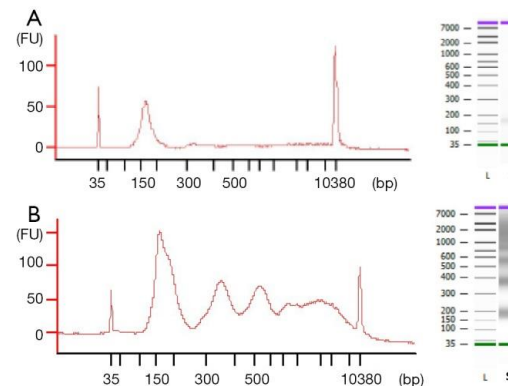


Apoptose : 166 pb

Range 88-166

Nécrose : >300 pb

(>10000 pB)



Electropherogram and gel-like image of cfDNA samples

Clara Pérez-Barrios Transl Lung Cancer Res 2017

Impact sur la quantité extraite*

Impact des traitements sur la taille de l'ADNct**

*Devonshire AS Anal Bioanal Chem 2014, Fong SL Clin Chem 2009 ; Pinzani P Clin Chim acta 2010, Schmidt B Clin Chem 2005)

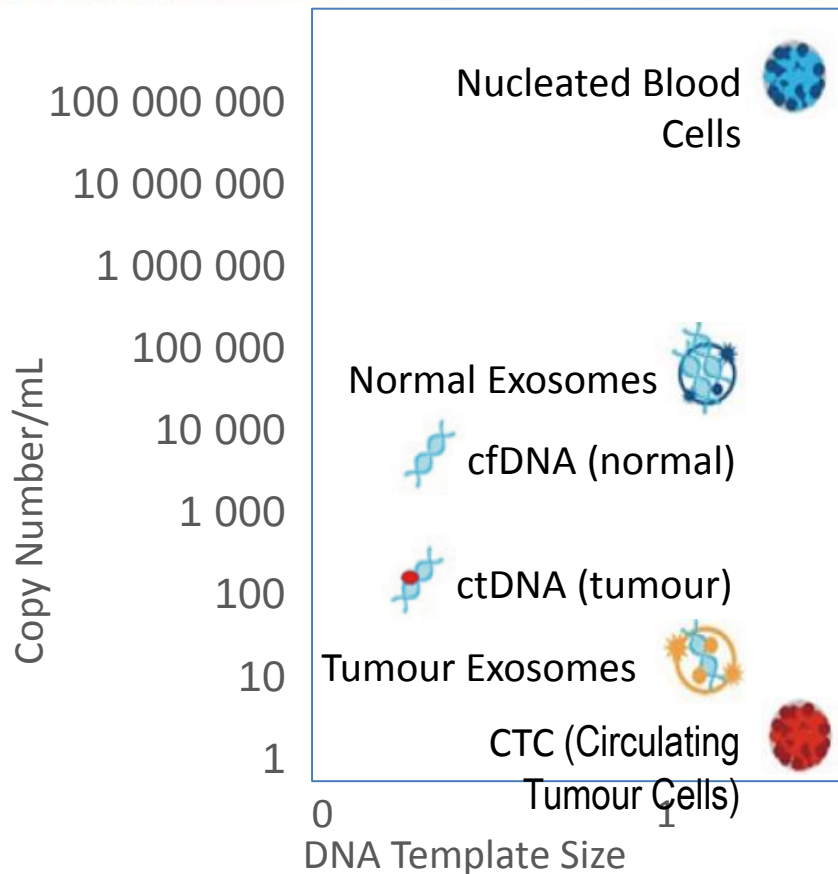
**Costa DB. PLoS Med 2007;4:1669-79; discussion 1680.

Affirmations

- **ACCORD / DESACCORD**
- Nécessite d'adapter les méthodes d'extraction
- Nécessite d'adapter les méthodes d'analyses
- Permet de différencier l'ADN d'origine néoplasique de l'ADN normal
- Peut être modifié par les traitements

ADN tumoral circulant

Quelles modalités analytiques des tests : la LOD



Stade précoce ou détection de la récidue

- 5 ng/mL = 1500 EG
- FA = 1%
- Détection de 15 copies si PE= 1mL

Stades avancés 2 exemples :

- Patients : 17 ng/ml (0.5–1600)
Contrôles sains : 7,4 (5,5-13,3)
(Perkins G. Plos One 2012)
- Patients (CCR, CBNPC) : 1200 ng/mL (200-24000)
(Perez-Barrios C. Trans Lung Cancer Res 2016)

Méthode avec une sensibilité de 1% est capable de détecter :

200 copies dans 20000 copies (75 ng)

20 copies dans 2000 copies (7,5 ng)

Si LOD absolue >20 copies : la PE doit être > 7,5 ng

Affirmations

- La concentration en ADNct varie au cours de l'évolution de la pathologie (charge tumorale)
- Une méthode ayant une sensibilité (LOD) de 1% est capable de détecter un variant présent dans 1% de l'ADN circulant
- Aux stades précoces, il est nécessaire d'utiliser au moins 2 mL de plasma
- La fréquence allélique varie de 0,1 à 50%

- **ACCORD** / **DESACCORD**

ADN tumoral circulant

Quelles modalités analytiques : les PCR quantitatives

Données fabricant

Kit	Fabricant	mutations	sensibilité	méthode	appareil
cobas® EGFR Mutation Test V2 CE-IVD	Roche Diagnostics	Exon 18: G719X Exon 19: 29 deletions and complex mutations Exon 20: S768I Exon 20: T790M Exon 20: 5 insertions Exon 21: L858R Exon 21: L861Q	Sensibilité : 1,3 à 13,4 (T790M 2,5%)* pour 50ng PE ADN tissu 100 copies dans 10000 copies wt (1%) ADN cisailé <200pb	amplification des cibles/détection par sondes Taqman (FRET) amplification sélective des cibles de l'échantillon (AmpErase)	Roche cobas z 480 analyser
therascreen® EGFR Plasma RGQ PCR Kit CE-IVD	Qiagen	Del. exon 19, T790M, L858R	■Sensibilité de 1,45 à 17,5 (T790M)	Technologie ARMS Scorpion	Qiagen Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM instrument
EGFR29 Mutation Detection Kit³ CE-IVD (CFDA-IVD for China)	AmoyDx	Exon 18: G719X Exon 19: 19 deletions Exon 20: S768I Exon 20: T790M Exon 20: 3 insertions Exon 21: L858R Exon 21: L861Q	1 à 2,5% (T790M)	Technologie ARMS Scorpion	None specified
PNAClamp™ EGFR Mutation Detection Kit⁴ CE-IVD	Panagene	Exon 18: G719X Exon 19: 26 deletions Exon 20: S768I or an insertion Exon 20: T790M Exon 20: 5 insertions and H773L Exon 21: L858R Exon 21: L861Q	<1% (?)	PNA blockers et SYBR green detection	Multiple

Affirmations

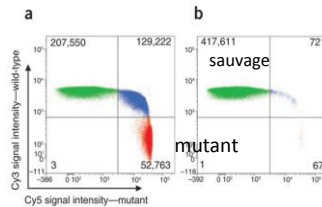
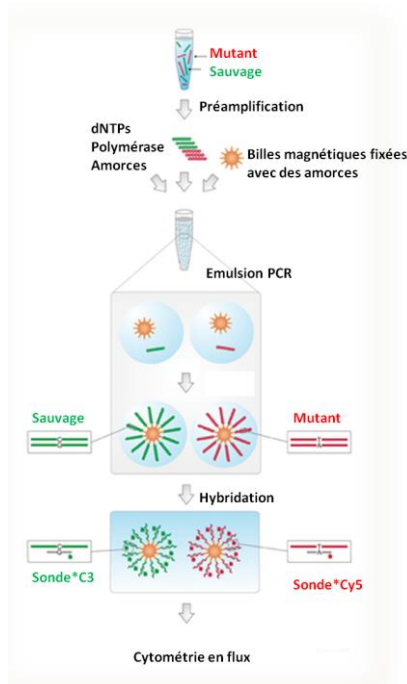
- **ACCORD / DESACCORD**
- Sensibilité de la qPCR classique est suffisante
- On peut multiplexer jusqu'à 48 mutations dans une PCR
- On peut augmenter la sensibilité jusqu'à 0,1% de sensibilité en privilégiant l'amplification des cibles mutées

ADN tumoral circulant

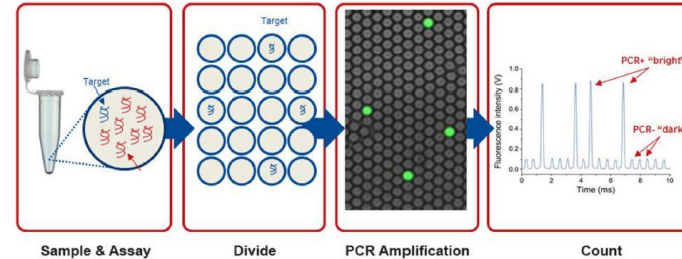
Quelles modalités analytiques : les PCR numériques

BEAMing

Beads, Emulsion, Amplifications and Magnetics

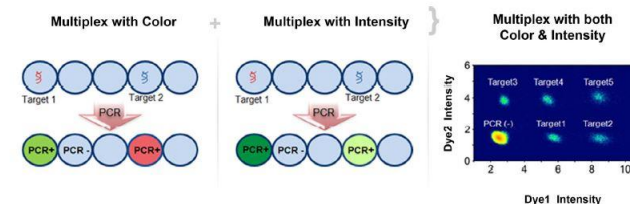


PCR digitale



1 goutte (nL) = microréaction de PCR dans laquelle les fragments mutés et sauvages sont différenciés par fluorescence.

- Détection d'évènements rares
- Quantification par la loi de poisson
- Multiplexage et ratio



ADN tumoral circulant

Quelles modalités analytiques : les PCR numériques

Les plateformes disponibles

marque	Instrument	consommables	Partition	qPCR	Multiplexing
Fluidigm Corp	BioMark HD	12 matrices par puces 765 puits par matrice	9,180 partitions, 6 nl par partition	OUI	5 couleurs 5 cibles
	EP1	48 matrices par puce 770 puits par matrice	36,960 partitions, 0.85 nl par partition	NON	5 couleurs 5 cibles
Life Technologies	OpenArray RealTime PCR System et QuantStudio 12K Flex instrument	OpenArray plates	3,072 partitions par plate, 48 subarrays par plaques, 33 nl per partition	OUI	2 couleurs 2 cibles
Life Technologies	QuantStudio 3D Digital PCR	QuantStudio™ 3D Digital PCR Chips	Reaction-well volume of 755 pL (v2 chip) or 809 pL (v1 chip) 200000 puits par puces 1 ech pour 2 puces	OUI	2 couleurs Fam/Vic 2 cibles
Bio-Rad lab	QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR™)	DG8™ Cartridges DG8™ Gaskets 8 samples par cartridges (	96 ech par run 1nl par partition 13440000 partitions 14,000-16,000 gouttes par ech	NON	FAM (EvaGreen), HEX (VIC) 2 cibles ou multiplexage par intensité
RainDance	RainDrop Digital PCR System	Source and Sense chips 8 ech par puce	5-10 millions de gouttes par ech run de 8 ech	NO	FAM (512 nm) and VIC (543 nm) 2 cibles
Stilla	Naica™ System	Crystal dPCR Réseau 2D : Puces de 4 échantillon	25,000 à 30,000 gouttes 12 ech par run	NO	3 couleurs 3 cibles

Difficultés

-LOD : introduire suffisamment d'échantillon pour qu'il y aie au moins 1 fragment

-Attention aux pertes de matériel en phase pré-analytique

-design: s'assurer que le signal correspond bien à une cible et qu'une molécule puisse être détectée

-les inhibiteurs peuvent donner des faux négatifs

-les séquences analysées ne doivent pas être sur le même fragment

-spécificité : attentions aux pseudo-gènes

-qPCR permet de suivre la cinétique et d'éliminer des faux +

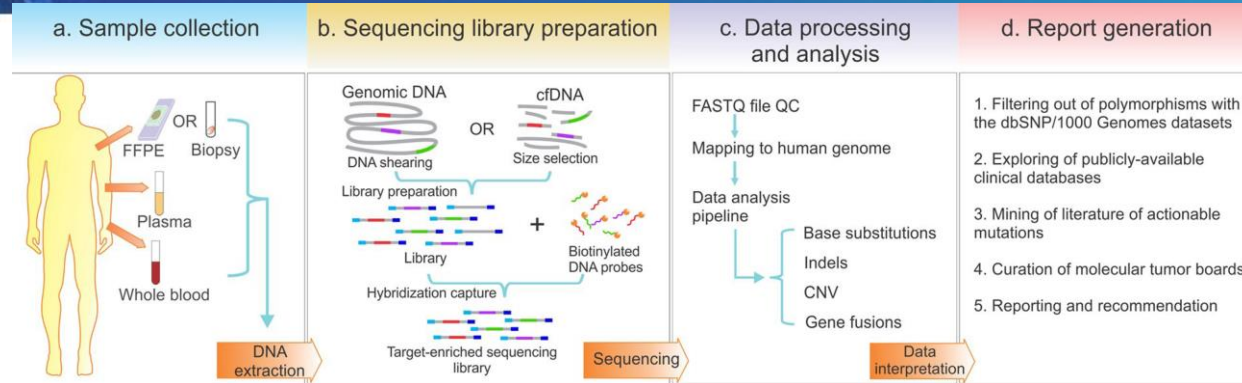
Affirmations

- La limite de détection est indépendante de la quantité en ADN introduite dans le système
- La méthode ne présente pas de risque de faux négatif
- C'est le seul système qui permet une quantification absolue de la fréquence allélique
- Présente le coût le plus bas par échantillon

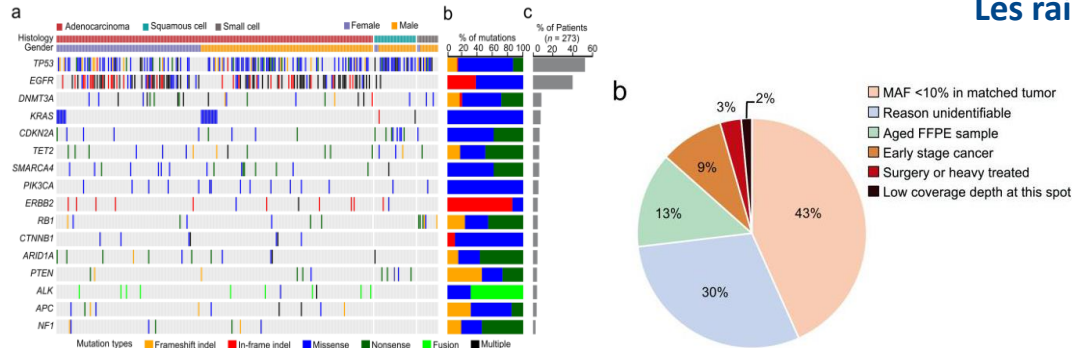
- **ACCORD / DESACCORD**

ADN tumoral circulant

Quelles modalités analytiques : le NGS



-605 cancers dont 373 cancers du poumon
-NGS ciblé capture : 5804 exons de 382 gènes
-Couverture X300
-Cut-off 1%
-Miseq; HISEq 4000
-87% mutation dans ADNct – 54% traitables



Les raisons des discordances NGS tissu/NGS ADNct

Fréquence allélique : variable dans les tissus (m=23%) (hétérogénéité) et faible dans le sang (m=5%, 66% : FA<10%)

Région riches en GC et séquences répétitives sont moins bien détectée dan le plasma que dans les tissus (faible FA)

CNV plus difficilement analysés sur ADNc

Interférence des traitements

Temporalité des prélèvements

ADN tumoral circulant

Quelles modalités analytiques : le NGS

Method	Description	Detection limit (% ctDNA)	Strengths	Limitations
NGS amplicon based	Deep sequencing of PCR amplicons	0.01–2.00	High sensitivity (some methods); less expensive than other NGS methods	Less comprehensive than other NGS methods; unable to detect SCNAs; unable to detect rearrangements without assay customization
WGS	Deep sequencing of entire genome	1.00	Interrogating entire genome;	Expensive; low sensitivity; mostly limited to SCNA detection
WES	Deep sequencing of exons			Expensive; low sensitivity
CAPP-Seq *	Targeted hybrid capture			Less comprehensive than WGS or WES
iDES-enhanced CAPP-Seq	Targeted hybrid capture integrated digital error suppression			Less comprehensive than WGS or WES

CAPP-Seq = Avenio (Roche)
-Targeted 17 gènes
-Expanded 77 gènes
-Surveillance 197 gènes
4 catégories
(mutations, Fusions, Indels)
NextSeq

*Cancer Personalized Profiling by deep SEQuencing



ADN tumoral circulant

Analytique : NGS

- **ACCORD / DESACCORD**

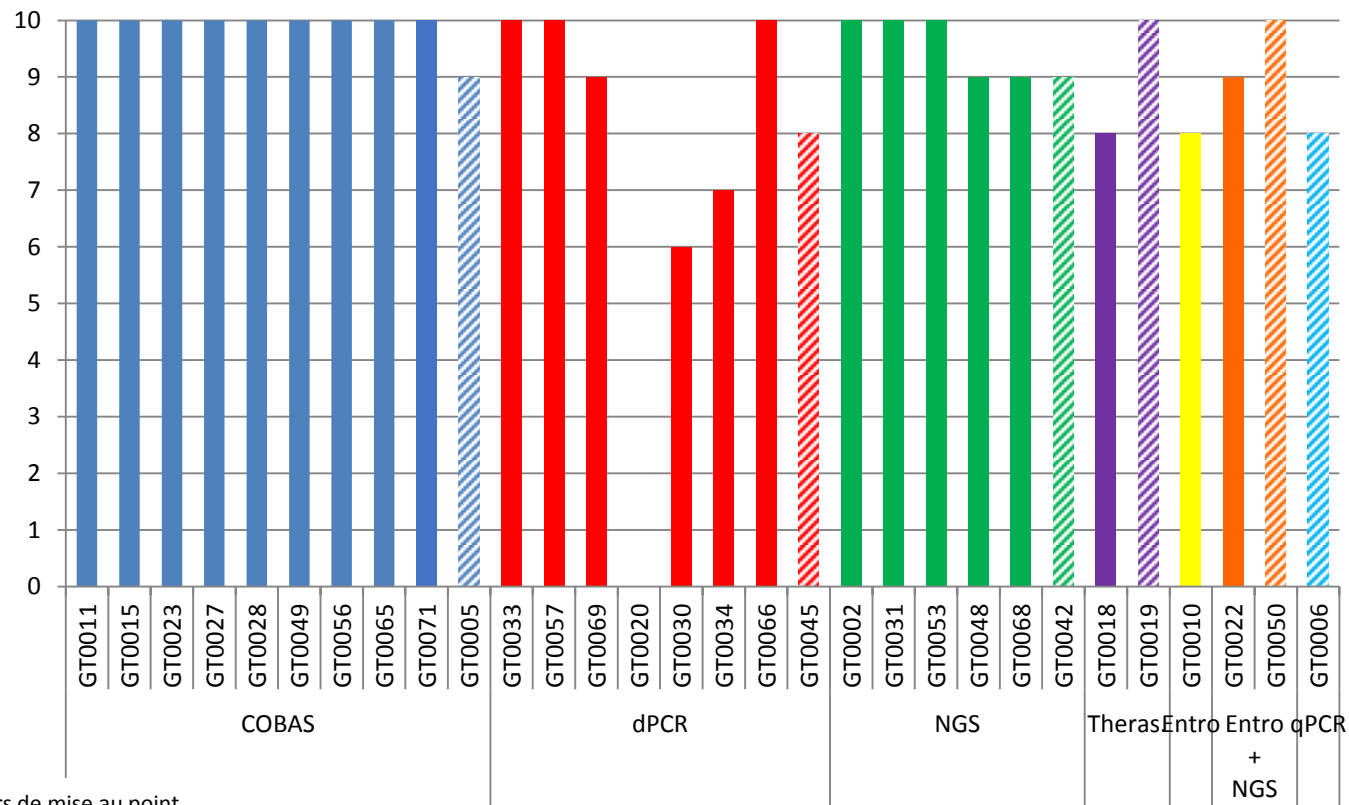
Affirmations

- On peut analyser l'ADNct sur une plateforme développée pour l'ADN tissulaire
- Si on augmente la profondeur de lecture on augmente la sensibilité de la méthode
- Les techniques NGS sont applicables en routine en clinique pour le monitoring des thérapies ciblées
- La présence d'une mutation P53 chez un individu sain signe un cancer non détecté

ADN tumoral circulant

Technique d'analyse	Total	Utilisation routine	Validation en cours
COBAS	10	8 + 1 (recherche)	1
dPCR	8	7	1
NGS	6	5	1
Therascreen	2	1	1
Entrogen	1	1	
Entrogen + NGS	2	1	1
Pyroseq	1	1	
qPCR maison	1		1

ADN tumoral circulant





ADN tumoral circulant

Post Analytique

Le Compte-rendu doit comporter :

- Le Contexte de la prescription
- Le Traitement
- Le Volume de sang prélevé
- Le type de tube de prélèvement
- La Quantification de l'DN
- La description de la technique utilisée
- Un résultat type : Présence/absence de la mutation recherchée

- **ACCORD / DESACCORD**

Restitution

Recommandations pour analyser
et interpréter les résultats sur
ADNtc

Marc Denis et Pierre-Jean Lamy

Avec le soutien du



Groupe Français de
Cytogénomique Oncologique



Liens d'intérêt

Pierre-Jean Lamy : Biorad, Roche, AstraZeneca

Marc Denis : Qiagen, Roche Pharma, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim



PLAN

1. Tour de table sur la pratique actuelle

2. Les prescriptions dans la CBNPC

3. Quelles modalités pré-analytiques ?

1. Les tubes de prélèvement
2. La centrifugation
3. Le volume de plasma à utiliser

4. Quelles modalités analytiques?

1. L'analyte
2. La limite de détection (LOD)
3. Les qPCR
4. Les PCR numériques
5. Le NGS

5. Contrôles qualités externes

6. Post analytique



Tour de table

Mise en routinede l'auditoire

Principales indications :

- CBNPC (EGFR, BRAF) 20
- CRC (RAS) 2
- Mélanome (BRAF, NRAS) 9
- Sein (ESR1, PIK3CA) 5
- Autres : prostate (AR), neuroblastome (NMYC, ALK), pancréas
- Urines : 2, LCR, ascites, LBA, ...



ADN tumoral circulant

Prescriptions dans le CBNPC

Affirmations

L'ADNtc peut être utilisé pour :

- Evaluer le pronostic du patient (quantité ADNtc)
- Rechercher des mutations au diagnostic en l'absence de prélèvement tissulaire
- Evaluer La réponse au traitement
- Détecter la maladie résiduelle
- Mettre en évidence les mutations de résistance (T790M)

- **ACCORD / DESACCORD**

- **NON**

- **OUI**

- qqs centres (hors recommandations)

- Pas vraiment

- **OUI (+ ampli MET, C797S, ...)**

Affirmations

- Le sérum ne doit pas être utilisé
- Le plasma EDTA peut être utilisé
- Les tubes EDTA doivent être centrifugés dans les 3-4h après le prélèvement
- Les tubes BCT (Streck) permettent une prise en charge dans les 10 jours
- L'utilisation des tubes cfDNA Roche a été validée avec des prélèvements de patients ayant un CBNPC
- Il existe d'autres tubes validés pour l'analyse de l'ADNtc

- **ACCORD / DESACCORD**

- Accord
- Accord
- Accord
- Accord jusqu'à 4j (tout le monde utilise les tubes stabilisant)
- 1 validation non publiée : 10 j
- Il existerait plus d'hémolyse ?
- Oui : qiagen pas de publication
- (Paxgene : dilution dans le stabilisant – non validé)

Affirmations

- Le plasma est récupéré après 2 centrifugations : basse vitesse puis haute vitesse
- Le plasma peut être conservé à -20°C pendant 1 semaine, ensuite à -80°C

- ACCORD / DESACCORD

- OUI

- Avant ou après congélation

- OUI

Affirmations

- Toutes les techniques d'extraction sont équivalentes
 - L'extraction doit se faire à partir d'un minimum de 2 ml de plasma
 - Il a été montré qu'augmenter le volume de plasma extrait augmentait la concordance avec les tests tissulaires (PPA)
- **ACCORD / DESACCORD**
 - **NON . Quantité variable.**
 - Utiliser une méthode validée
 - 1 validation non publiée : 10 j
 - Il existerait plus d'hémolyse ?
 - Oui : qiagen pas de publication
 - (Paxgene : dilution dans le stabilisant – non validé)

Affirmations

- Toutes les techniques d'extraction sont équivalentes
- L'extraction doit se faire à partir d'un minimum de 2 ml de plasma
- Il a été montré qu'augmenter le volume de plasma extrait augmentait la concordance avec les tests tissulaires (PPA)

- **ACCORD / DESACCORD**

- **Oui**

- **Oui**

- **Mais attention aux inhibiteurs avec les colonnes**



PLAN

1. Tour de table sur la pratique actuelle

2. Les prescriptions dans la CBNPC

3. Quelles modalités pré-analytiques ?

1. Les tubes de prélèvement
2. La centrifugation
3. Le volume de plasma à utiliser

4. **Quelles modalités analytiques?**

1. L'analyte
2. La limite de détection (LOD)
3. Les qPCR
4. Les PCR numériques
5. Le NGS

5. **Contrôles qualités externes**

6. **Post analytique**

Affirmations

- Nécessite d'adapter les méthodes d'extraction
- Nécessite d'adapter les méthodes d'analyses
- La taille permet de différencier l'ADN d'origine néoplasique de l'ADN normal
- Taille et quantité peuvent être modifiées par les traitements
- **ACCORD / DESACCORD**
- Oui, méthodes validées
- Workflow spécifique ADN circulant
- Oui, aussi profils de méthylation spécifiques
- Oui

Quelles modalités analytiques des tests : la LOD

Affirmations

- La concentration en ADNct varie au cours de l'évolution de la pathologie (charge tumorale)
 - Une méthode ayant une sensibilité (LOD) de 1% est capable de détecter un variant présent dans 1% de l'ADN circulant
 - Aux stades précoces, il est nécessaire d'utiliser au moins 2 mL de plasma
 - La fréquence allélique varie de 0,1 à 50%
- ACCORD / DESACCORD
 - OUI
 - Oui, mais attention à la quantité d'ADN analysée
 - Oui
 - Oui

Affirmations

- La sensibilité de la qPCR classique est suffisante
 - On peut multiplexer jusqu'à 48 mutations dans une PCR
 - On peut augmenter la sensibilité jusqu'à 0,1% de sensibilité en privilégiant l'amplification des cibles mutées
- **ACCORD / DESACCORD**
 - **Désaccord : nécessité d'enrichir**
 - **Oui en théorie, en pratique**
 - **Dépend de la quantité d'ADN initial**

Affirmations

- La limite de détection est indépendante de la quantité en ADN introduite dans le système
 - ACCORD / DESACCORD
- La méthode ne présente pas de risque de faux négatif
 - NON
- C'est le seul système qui permet une quantification absolue de la fréquence allélique
 - NON
- Présente le coût le plus bas par échantillon
 - OUI ?
- Présente le coût le plus bas par échantillon
 - Ca dépend !



ADN tumoral circulant

Analytique : NGS

Affirmations

- On peut analyser l'ADNct sur une plateforme développée pour l'ADN tissulaire
 - Si on augmente la profondeur de lecture on augmente la sensibilité de la méthode
 - Les techniques NGS sont applicables en routine en clinique pour le monitoring des thérapies ciblées
 - La présence d'une mutation P53 chez un individu sain signe un cancer non détecté
- **ACCORD / DESACCORD**
 - **Oui mais avec bio-info dédiée**
 - **Oui avec barcoding**
 - **En routine ?**
 - **Non**