

ATELIER 2

VERS DE NOUVELLES APPLICATIONS DE L'ADNtc : MONITORING, DIAGNOSTIC ET PRÉDICTION DES RECHUTES

Pr Karen Leroy, Paris & Pr Léa Payen, Lyon

Avec le soutien du

GFCO

Groupe Francophone de
Cytogénomique Oncologique

AstraZeneca 

LIENS D'INTERET

- Lea PAYEN : AstraZeneca, BMS
- Karen LEROY : Roche, Nanostring, MSD, BMS, AstraZeneca, Thermofisher

■ 1) Place des analyses de l'ADNtc dans la prise en charge des CBNPC

- Q1 : Faut-il faire une analyse de l'ADNtc au diagnostic ? si oui, chez quels patients ?
- Q2 : Monitoring des pts sous TKI (EGFR/ALK/ROS1) : discussion des indications de prélèvements (systématique ? à progression clinique ou radiologique?), des seuil de détection (FN) en fonction des techniques
- Q3 : Monitoring ADNtc en dehors des pts sous TKI : y a t-il des indications (détection précoce de la réponse thérapeutique / des rechutes ?)

■ 2) Place des analyses de l'ADNtc dans la prise en charge des autres cancers

- Q4 : place des analyses RAS dans CRC (au moment de la mise en route anti-EGFR, lignes ultérieures)
- Q5 : place des analyses ESR1 dans cancer du sein
- Q6 : place des analyses BRAF dans mélanome

■ 3) Aspects méthodologiques

- Q7 : quantification ADN tumoral circulant (taille méthylation)
- Q8 : nouveaux marqueurs (TMB, fusion etc....)

Place de l'analyse de l'ADNtc dans la prise en charge des CBNPC

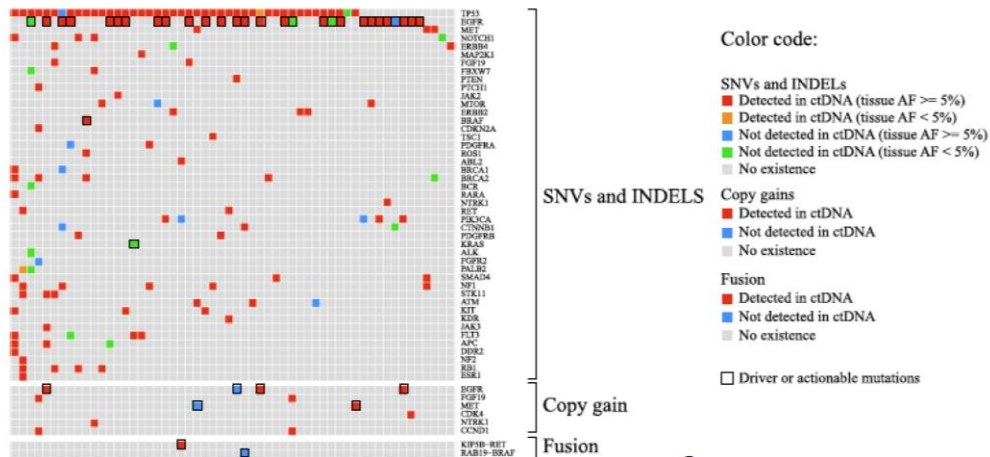
QUESTION N°1 Faut-il faire une analyse de l'ADNtc au diagnostic ? si oui, chez quels patients ?

DISCUSSION

- Dans le poumon : à défaut de tissu en quantité suffisante, recherche des altérations EGFR/ RAS /BRAF dans l'ADN circulant
- Quel est le profil des patients à inclure ?

■ **WARNING :**

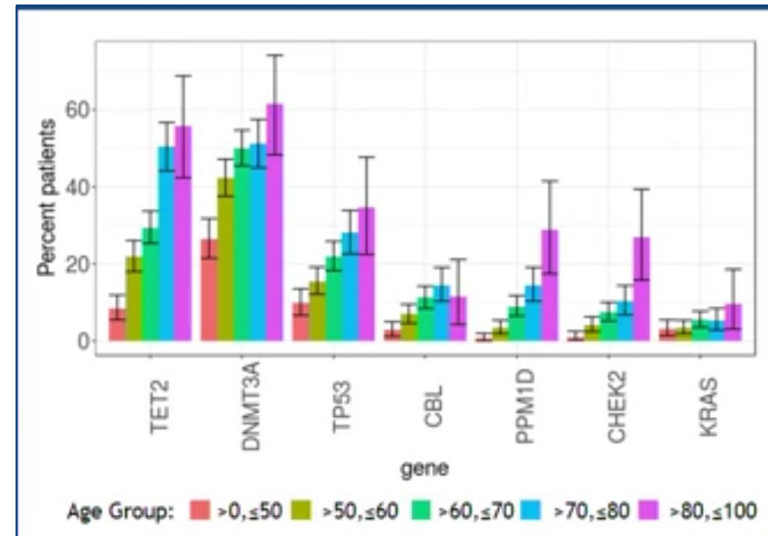
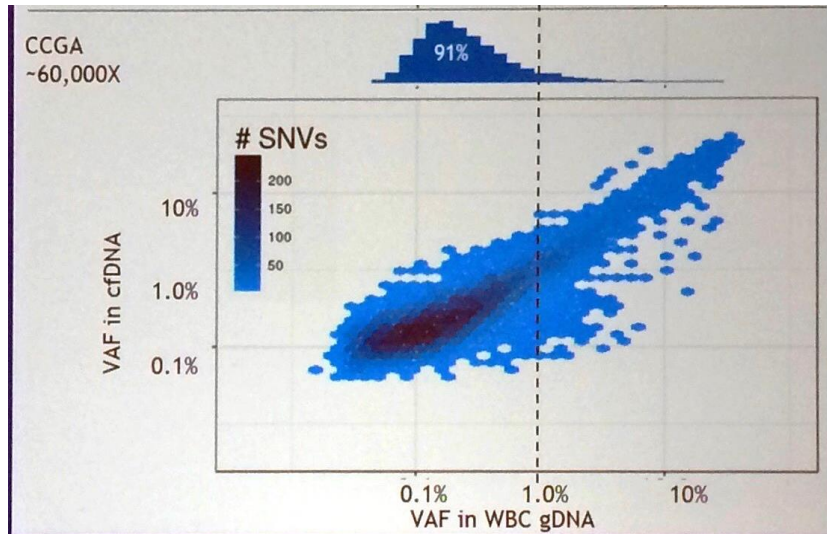
- % de non contributif ?
- Surcoût au niveau des actes de biologie ?
- Non caractérisation en routine sur ADN circulant des réarrangements
- Non localisation du clone tumoral positif ?



BMC Cancer. 2018; 18: 319. Published online 2018 Mar 23.
doi:10.1186/s12885-018-4199-7

Place de l'analyse de l'ADNtc dans la prise en charge des CBNPC

QUESTION N°1 Faut-il faire une analyse de l'ADNtc au diagnostic ? si oui, chez quels patients ?



Prevalence of clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) measured by an ultra-sensitive sequencing assay : Exploratory analysis of the Circulating Cancer Genome Atlas (CCGA) study.
Swanton C et al, ASCO 2018, ab 12003

Place de l'analyse de l'ADNtc dans la prise en charge des CBNPC

QUESTION N°1 Faut-il faire une analyse de l'ADNtc au diagnostic ? si oui, chez quels patients ?

■ Affirmation

- Une analyse de l'ADNtc à la recherche de mutation EGFR / BRAF/KRAS est justifiée chez les patients ayant un adénocarcinome localement avancé / métastatique en absence de tissu contributif pour l'analyse moléculaire
- Cette analyse est également justifiée chez les pts NON fumeurs ayant un carcinome épidermoïdes
- Si l'analyse est non contributive, il faut préconiser une autre analyse sur tissu (rebiopsie) ou plasma
- Il peut exister des résultats « faussement positifs » (mutation détectée distincte du CBNPC)

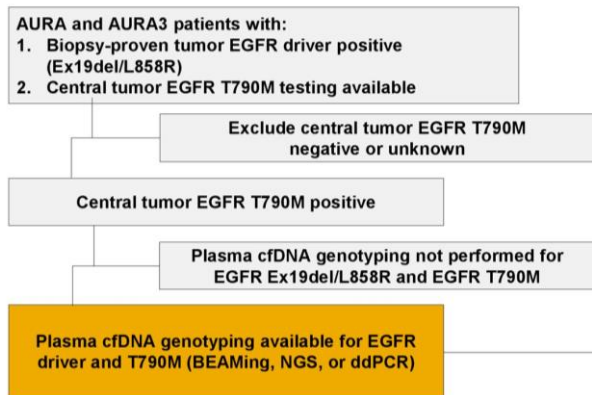
■ Accords de l'atelier

- xx
- Xx
- Xx
- xx

Place de l'analyse de l'ADNtc dans la prise en charge des CBNPC

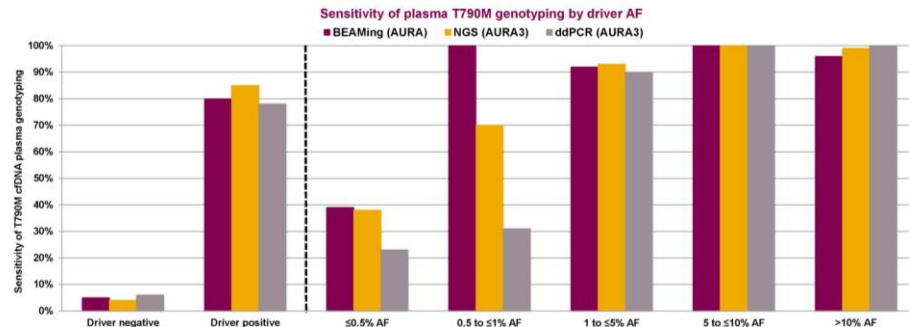
QUESTION N°2 Monitoring des pts sous TKI (EGFR/ALK/ROS1) : discussion des indications de prélèvements (systématique ? à progression clinique ou radiologique?), des seuil de détection (FN) en fonction des techniques

A.



*Driver positivity defined by performance characteristics of each individual assay and was pre-determined by the assay supplier

B.



Sensitivity	Driver negative	Driver positive	Driver allele frequency				
			≤0.5%	0.5 to ≤1%	1 to ≤5%	5 to ≤10%	>10%
AURA BEAMing 111/158 (70%)	1/21 (5%)	110/137 (80%)	15/38 (39%)	12/12 (100%)	23/25 (92%)	11/11 (100%)	49/51 (96%)
AURA3 NGS 207/316 (66%)	3/76 (4%)	204/240 (85%)	15/39 (38%)	16/23 (70%)	54/58 (93%)	30/30 (100%)	89/90 (99%)
AURA3 ddPCR 126/205 (61%)	3/48 (6%)	123/157 (78%)	6/26 (23%)	5/16 (31%)	27/30 (90%)	15/15 (100%)	70/70 (100%)

Presented at ASCO 2018 American Society of Clinical Oncology, Chicago, Illinois, 1–5 June 2018

Refining the sensitivity of plasma cell-free DNA (cfDNA) genotyping by controlling for plasma tumor content., Meador et al, ASCO 2018, ab 9071

Place de l'analyse de l'ADNtc dans la prise en charge des CBNPC

QUESTION N°2 Monitoring des pts sous TKI (EGFR/ALK/ROS1) : discussion des indications de prélèvements (systématique ? à progression clinique ou radiologique?), des seuil de détection (FN) en fonction des techniques

■ Affirmation

- L'analyse de l'ADN tumoral circulant à la recherche des mutations de résistance doit être réalisée à la progression clinique / radiologique
- Un faible taux de mutation driver (< 1%) doit être interprété avec précaution (à contrôler sur un prélèvement ultérieur).
- Le panel de mutations de résistance à rechercher doit être adapté à la mutation driver et au traitement en cours (TKI-EGFR 1^{er}/2^{eme}/3^{eme} génération; TKI-ALK, TKI-ROS1, TKI-MET...)

■ Accords de l'atelier

■ xx

■ Xx

■ Xx

Place de l'analyse de l'ADNtc dans la prise en charge des CBNPC

QUESTION N°3 Monitoring ADNtc en dehors des pts sous TKI : y a t-il des indications (détection précoce de la réponse thérapeutique / des rechutes ?)

- **Dans le poumon sous chimiothérapie ou immunothérapie**
 - Reflet de l'efficacité thérapeutique des traitements ?

Place de l'analyse de l'ADNtc dans la prise en charge des CBNPC

QUESTION N°3 Monitoring ADNtc en dehors des pts sous TKI : y a t-il des indications (détection précoce de la réponse thérapeutique / des rechutes ?)

■ Affirmation

- En dehors des mutations de résistance aux TKI, il n'y a pas d'indication validée au suivi de l'ADNtc pour orienter les stratégies thérapeutiques
- L'analyse de l'ADNtc peut être justifiée si les données cliniques /imagerie ne permettent pas de trancher sur une éventuelle progression

■ Accords de l'atelier

- Xx

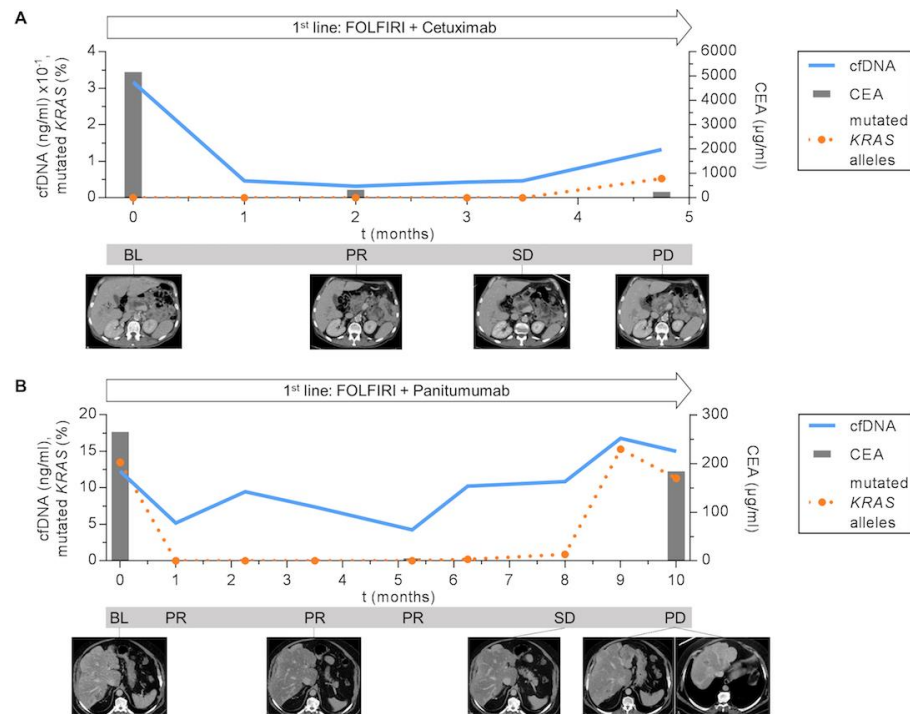
xx

Place des analyses de l'ADNtc dans la prise en charge des autres cancers

QUESTION N°4 place des analyses RAS dans CRC (au moment de la mise en route anti-EGFR, lignes ultérieures)

■ Dans le colon : évolution de la fraction mutée

- Valeur pronostique
- Reflet de l'efficacité thérapeutique
- Si disparition du clone RAS et lors d'une progression tumorale => possibilité de discuter en RCP l'intérêt de la mise en place d'un traitement par anti-EGFR



. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174308>

Place des analyses de l'ADNtc dans la prise en charge des autres cancers

QUESTION N°4 place des analyses RAS dans CRC (au moment de la mise en route anti-EGFR, lignes ultérieures)

■ Affirmation

- La présence d'une mutation des gènes KRAS/NRAS peut être réalisée sur l'ADNtc avant la première ligne de traitement en situation métastatique s'il n'y a pas eu d'analyse informative au niveau du tissu tumoral
- La présence de mutations des gènes KRAS/NRAS peut/doit être réalisée sur l'ADNtc avant la mise en route des lignes de traitement ultérieure dans les tumeurs WT (apparition / disparition des sous-clones mutés sélectionnés par les thérapies utilisées).

■ Accords de l'atelier

- Xx

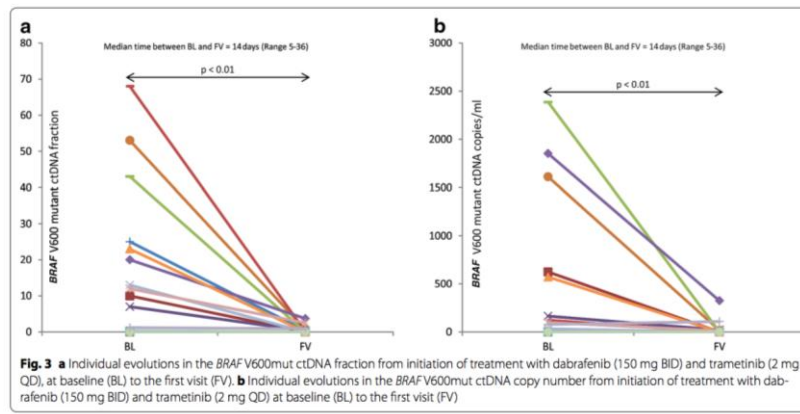
xx

Place des analyses de l'ADNtc dans la prise en charge des autres cancers

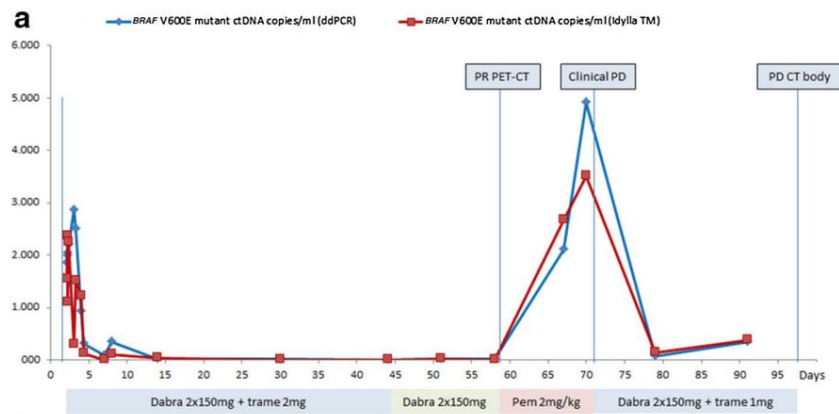
QUESTION N°5 Place des analyses BRAF dans le mélanome

■ Dans le mélanome

■ Reflet de l'efficacité thérapeutique



- Signe précoce de progression du clone tumoral muté BRAF
- WARNING : la progression cérébrale.... => Faible release dans le sang



Schreuer et al. J Transl Med (2016) 14:95 DOI 10.1186/s12967-016-0852-6

Place des analyses de l'ADNtc dans la prise en charge des autres cancers

QUESTION N°5 Place des analyses BRAF dans le mélanome

■ Affirmation

- il n'y a pas d'indication validée au suivi de l'ADNtc pour orienter les stratégies thérapeutiques dans le mélanome

■ Accords de l'atelier

- Xx

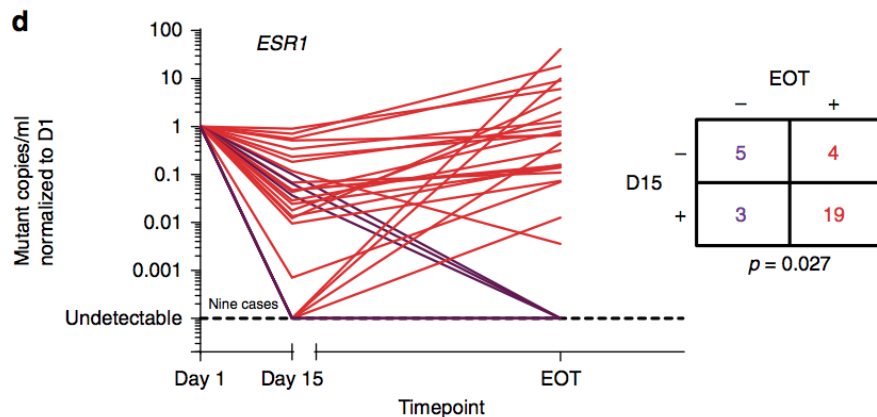
xx

Place des analyses de l'ADNtc dans la prise en charge des autres cancers

QUESTION N°6 Place des analyses ESR1 dans le cancer du sein

■ Dans le sein

- DOI: 10.1038/s41467-018-03215-x
- « These results suggest that early ctDNA dynamics may provide a robust biomarker for CDK4/6 inhibitors, with early ctDNA dynamics demonstrating divergent response of tumor sub clones to treatment
- Following validation in an independent clinical cohort, these data would support trials testing the hypothesis that a change in treatment strategy based on early ctDNA dynamics may improve outcome, by switching to another modality or adding additional treatment for patients with inadequate ctDNA suppression. «



Place des analyses de l'ADNtc dans la prise en charge des autres cancers

QUESTION N°6 Place des analyses ESR1 dans le cancer du sein

Format: Abstract ▾

Send to

Breast Care (Basel). 2017 Oct;12(5):309-313. doi: 10.1159/000481428. Epub 2017 Oct 25.

Are We Ready to Use ESR1 Mutations in Clinical Practice?

Jeselsohn R^{1,2}.

 Author information

Abstract

The recurrent ligand-binding domain *ESR1* mutations are an important mechanism of endocrine resistance in estrogen receptor-positive (ER+) metastatic breast cancer. These mutations evolve under the selective pressure of endocrine treatments and are rarely found in treatment-naïve ER+ breast cancers. Preclinical studies showed that these mutations lead to ligand-independent activity facilitating resistance to aromatase inhibitors and relative resistance to tamoxifen and fulvestrant. Retrospective analyses of *ESR1* mutations in baseline plasma circulating tumor DNA from clinical trials suggest that these mutations are prognostic of poor overall survival and predictive of resistance to aromatase inhibitors in metastatic disease. Larger datasets and prospective studies to confirm these results are lacking. In addition, response to other standard treatments for metastatic breast cancer in the presence of the *ESR1* mutations is unknown, and studies to determine the optimal treatment combinations for patients with *ESR1* mutations are also needed.

KEYWORDS: <italic>ESR1</italic> mutations; Circulating tumor DNA; Endocrine resistance; Estrogen receptor

PMID: 29234250 PMCID: [PMC5704725](#) [Available on 2018-10-01] DOI: [10.1159/000481428](#)

Place des analyses de l'ADNtc dans la prise en charge des autres cancers

QUESTION N°6 Place des analyses ESR1 dans le cancer du sein

■ Affirmation

- La détection des mutations du gène ESR1 **est / n'est pas indiquée** chez les patientes ayant un cancer du sein métastatique en progression sous anti-aromatase.

■ Accords de l'atelier

- Xx

Aspects méthodologiques

QUESTION N°7 Quantification ADN tumoral circulant (taille / méthylation)

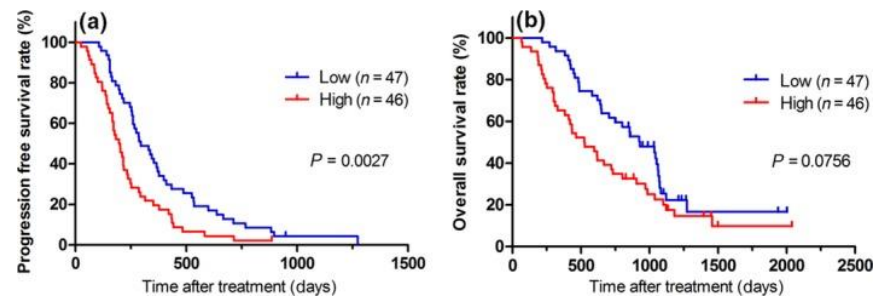
Différenciation de l'ADNcir total de l'ADNcir tumoral par la taille

« Prediction of the efficacy of immunotherapy by measuring the integrity of cell-free DNA in plasma in colorectal cancer »

The level of circulating cell-free DNA (cfDNA) and the integrity of the cfDNA, which is defined as the ratio of long-base pair (bp) cfDNA/short-bp cfDNA.

These two phenomena may be distinguished by the dimensions of the DNA fragments: the apoptotic death of cells causes the release of DNA fragments shorter than 200 bp into the circulation, whereas tumor necrosis is characterized by the presence of fragments that vary in size and are generally > 200 bp

DNA strand integrity was measured using semi-quantitative real-time PCR with LightCycler (Roche, Penzberg, Germany) to determine the integrity index, which was defined as the ratio of the relative abundances of 400-bp versus 100-bp PCR products of the β -actine gene that are likely present in all normal and neoplastic cells.



Kaplan-Meier survival plots of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in patients with a plasma cell-free DNA integrity value higher or lower than the median. (a) PFS. (b) OS. The log-rank test indicated that cell-free DNA integrity might be a predictive biomarker for PFS ($P = 0.0027$).

Cancer Sci. 2016 Dec;107(12):1825-1829. doi: 10.1111/cas.13085. Epub 2016 Dec 18.

Aspects méthodologiques

QUESTION N°7 Quantification ADN tumoral circulant (taille / méthylation)

Methylation of ctDNA

« The first EWAS identified 250 differentially methylated CpG islands in the peripheral blood samples of highrisk individuals that developed breast cancer during their postcancer monitoring, as compared to those that remained cancer-free [60]. »

Table 1. Summary of published studies on investigating diagnosis value of circulating methylated DNA in breast cancer patients

Author	Year	Sample size	Type of specimen	Gene	Method	Reference
Chimonidou et al.	2013	Control, 60; cancer, 114	Plasma	SOX17	qMSP	[46]
Chimonidou et al.	2013	Control, 37; cancer, 27 (discovery), 46 (metastatic), 123 (validation)	Plasma	CST6	MSP	[47]
Dulaimi et al.	2004	Control, 20; benign, 8; cancer, 34	Serum	RASSF1A, APC, DAP-kinase	MSP	[48]
Fu et al.	2015	Benign, 60; cancer, 155	Plasma	SOX17	MSP	[49]
Guerrero-Preston et al.	2014	Control, 20 (discovery), 86 (validation); cancer, 20 (discovery), 154 (validation)	Plasma	MAL, KIF1A, FKBP4, VGF, OGDHL	MSP	[50]
Haggras et al.	2014	Benign, 100; cancer, 120	Serum	ESR1	MSP	[51]
Hoque et al.	2006	Control, 76 (discovery), 38 (validation); cancer, 93 (discovery), 47 (validation)	Plasma	APC, GSTP1, RASSF1A, RARβ2	qMSP	[52]
Martínez-Galán et al.	2008	Control, 74; benign, 34; cancer, 106; postoperative, 60	Serum	ESR1, APC, RARβ, 14-3-3-σ, E-cadherin	qMSP	[53]
Ng et al.	2011	Control, 60 (discovery), 20 (validation); breast cancer, 60 (discovery), 38 (validation); gastric cancer, 45 (discovery), 20 (validation)	Plasma	SLC19A3	MSRED-qPCR	[39]
Radpour et al.	2011	Control, 30 (plasma, discovery); cancer, 36 (plasma, discovery), 20 (serum, validation)	Plasma, serum	APC, BIN1, BMP6, BRCA1, CST6, ESR-b, GSTP1, p16, p21, TIMP3	EpiTYPER™ assay	[54]
Sharma et al.	2011	Control, 30; cancer, 100	Serum	Maspin (SERPINB5)	MSP	[55]
Silva et al.	1999	Control, 17; cancer, 35	Plasma	P16INK4a	MSRE-PCR	[56]
Skvortsova et al.	2006	Control, 10; benign, 15; cancer, 20	Plasma	HIC-1, RASSF1A, RARβ2	MSP	[57]
Yamamoto et al.	2012	Control, 87; cancer, 159	Serum	GSTP1, RASSF1A, RARβ2	One-step MSP	[58]

Each of these 14 published studies used a candidate-gene approach.

qMSP=quantitative methylation-specific polymerase chain reaction; MSP=methylation-specific polymerase chain reaction; MSRED-qPCR=methylation-sensitive restriction enzyme digestion and real-time quantitative polymerase chain reaction; MSRE-PCR=methylation-sensitive restriction enzyme digestion real-time polymerase chain reaction.

Cancers (Basel). 2018 Apr; 10(4): 101. Published online 2018 Apr 1.
doi: 10.3390/cancers10040101
DOI:10.1093/jnci/djt045 Advance Access publication April 10, 2013

Aspects méthodologiques

QUESTION N°7 Quantification ADN tumoral circulant (taille / méthylation)

CCGA is a Prospective Longitudinal Cohort Study Designed for Early Cancer Detection (NCT02889978)

Enrollment



15,000+ participants

70% with cancer

- Previously untreated
- Any malignancy

30% without cancer

- Benign comorbid conditions were not excluded

Sample Collection



Blood samples
(from all participants)



Tissue samples
(cancer only)



Clinical data
All pts

Sequencing and Follow-Up for 5 Years



Targeted sequencing: cfDNA, WBCs



Whole-genome sequencing: cfDNA, WBCs



Targeted & whole-genome bisulfite sequencing: cfDNA



Whole transcriptome sequencing: cfRNA



Whole genome sequencing: tumor tissue



Pts with cancer: Treatment, recurrence, mortality

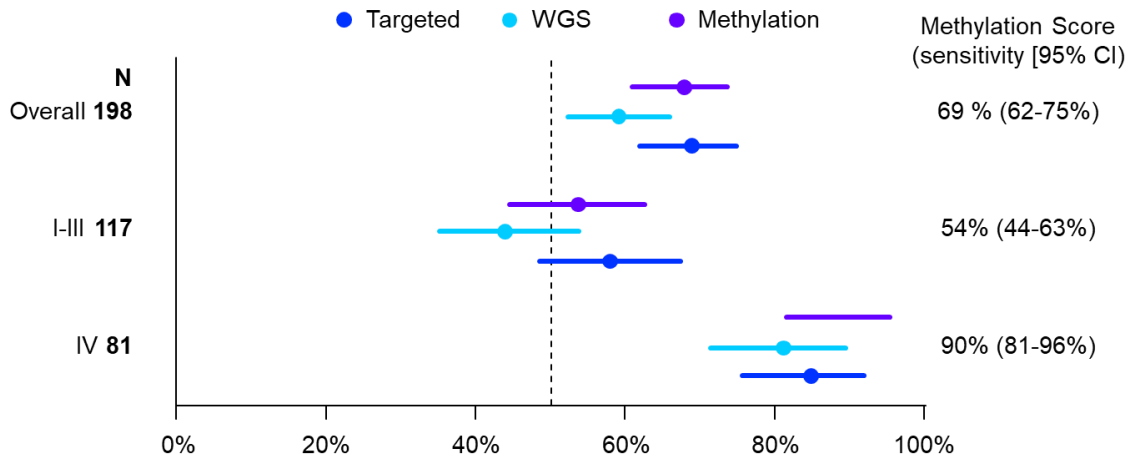


Pts without cancer: Remain cancer free or new cancer diagnosis, data on cancer status & treatment mortality

Aspects méthodologiques

QUESTION N°7 Quantification ADN tumoral circulant (taille / méthylation)

- ⊕ High biological signal (>50% sensitivity overall on any assay) in typically unscreened cancers with high mortality (>50%, SEER). Sensitivity for Stage I-III and Stage IV at 98% specificity is reported in aggregate for esophageal, Hepatobiliary, lung, Ovarian, and pancreatic cancers.



Development of a comprehensive cell-free DNA (cfDNA) assay for early detection of multiple tumor types: The Circulating Cell-free Genome Atlas (CCGA) study. Klein et al, ASCO 2018, ab 12021

Aspects méthodologiques

QUESTION N°7 Quantification ADN tumoral circulant (taille / méthylation)

Ann Oncol. 2018 May 1;29(5):1211-1219. doi: 10.1093/annonc/mdy061.

RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study.

Bachet JB^{1,2,3,4}, Bouché O^{4,5}, Taieb J^{4,6}, Dubreuil O^{3,4}, Garcia ML^{4,7}, Meurisse A⁸, Normand C², Gornet JM^{4,9}, Artru P^{4,10}, Louafi S^{4,11,12}, Bonnetain F⁸, Thirot-Bidault A^{4,13}, Baumgaertner I^{4,14}, Coriat R^{4,15}, Tougeron D^{4,16}, Lecomte T^{4,17}, Mary F^{4,18}, Aparicio T^{4,9,18}, Marthey L^{4,19}, Taly V², Blons H^{2,20}, Vernerey D⁸, Laurent-Puig P².

Author information

Abstract

BACKGROUND: RAS mutations are currently sought for in tumor samples, which takes a median of almost 3 weeks in western European countries. This creates problems in clinical situations that require urgent treatment and for inclusion in therapeutic trials that need RAS status for randomization. Analysis of circulating tumor DNA might help to shorten the time required to determine RAS mutational status before anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy for metastatic colorectal cancer. Here we compared plasma with tissue RAS analysis in a large prospective multicenter cohort.

PATIENTS AND METHODS: Plasma samples were collected prospectively from chemotherapy-naïve patients and analyzed centrally by next-generation sequencing (NGS) with the colon lung cancer V2 Ampliseq panel and by methylation digital PCR (WIF1 and NPY genes). Tumoral RAS status was determined locally, in parallel, according to routine practice. For a minimal κ coefficient of 0.7, reflecting acceptable concordance (precision ± 0.07), with an estimated 5% of non-exploitable data, 425 subjects were necessary.

Aspects méthodologiques

QUESTION N°7 Quantification ADN tumoral circulant (taille / méthylation)

■ Affirmations

- La dérégulation de la méthylation des promoteurs de gènes dans les cellules tumorales est un biomarqueur intéressant ($\pm$ cancer dépendant)
- L'analyse de la méthylation sera probablement intégrée dans les prochains tests développés pour la détection et/ou le suivi de l'ADNtc, après détermination de signatures spécifiques.

■ Accords de l'atelier

- Xx

xx

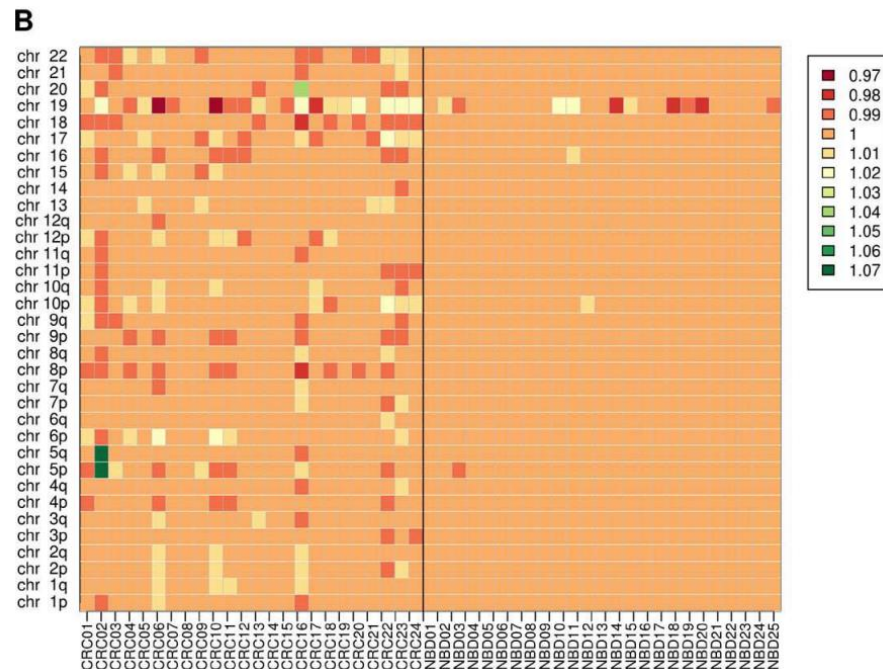
Aspects méthodologiques

QUESTION N°7 Quantification ADN tumoral circulant (taille / méthylation)

A feasibility study of colorectal cancer diagnosis via circulating tumor DNA derived CNV detection

Est ce un paramètre pertinent en soi?

« With 25 normal and 24 CRC samples, we achieve 100% specificity (lower bound confidence interval: 86%) and ~79% sensitivity (95% confidence interval: 63% - 95%), though the performance should be considered with caution given the limited sample size. We report a lack of concordance between the CNVs detected via cfDNA sequencing and CNVs identified in parent tissue samples. However, recent findings suggest that a lack of concordance is expected for CNVs in CRC because of their sub-clonal nature. »



PLoS One. 2018; 13(5): e0196826.

Published online 2018 May 23. doi: 10.1371/journal.pone.0196826

Aspects méthodologiques

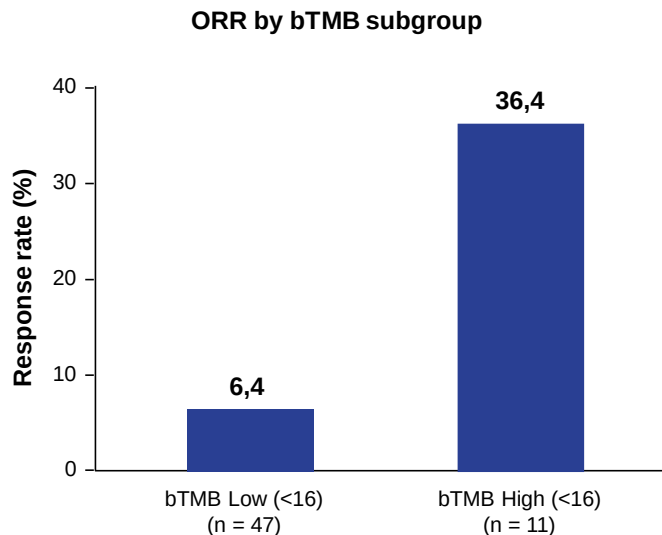
QUESTION N°8 Nouveaux marqueurs (TMB, fusion etc....)

Indication	Total N	N with kRE	%	ALK	RET	ROS1	FGFR3	FGFR2	EGFR	PDGFRB	FGFR1	MET	PDGFRA	RAF1	BRAF	ERBB2
Lung	2709	134	4.9%	78	20	19	7		4	2	2	1	1		1	
Non-lung	3862	93	2.4%	20	16	14	13	12	6	3	1	2	2	2	1	2
Breast	933	16	1.7%	3	4		3	2	2					1		1
Unknown primary	618	19	3.1%	4	2	6	2	4	1							
Prostate	390	8	2.1%	3	1	2	2									
Colorectal	500	18	3.6%	5	3	3		2	1	1		2	2		1	
Pancreas	332	9	2.7%	1	3	1		1		1				1		
Liver	120	5	4.2%	1				3		1						
Ovarian	181	1	0.6%		1											
Bladder	57	3	5.3%		1		2									
Esophagus	56	2	3.6%				1		1							

*Landscape of kinase rearrangements (kRE) detected in circulating tumor DNA (ctDNA).
Creelan et al, ASCO ab 12041*

Aspects méthodologiques

QUESTION N°8 Nouveaux marqueurs (TMB, fusion etc....)



Prospective clinical evaluation of blood-based tumor mutational burden (bTMB) as a predictive biomarker for atezolizumab (atezo) in 1L non-small cell lung cancer (NSCLC): Interim B-F1RST results. Velcheti et al, ASCO ab 12001

Aspects méthodologiques

QUESTION N°8 Nouveaux marqueurs (TMB, fusion etc....)

■ Affirmations

- L'analyse de l'ADNtc permet la mesure de la charge mutationnelle et la détection des réarrangements, mais les techniques nécessaires à ces analyses ne sont pas encore déployées en routine sur toutes les plateformes de génétique somatique des cancers

■ Accords de l'atelier

- Xx



DISCUSSION

Avec le soutien du

GFCO

Groupe Francophone de
Cytogénomique Oncologique

AstraZeneca 