

7^e ÉDITION

JOURNÉES DU GFCO 2021

Biomarqueurs et analyses moléculaires en oncologie

Avec la participation
scientifique du



Pièges de l'analyse tumorale sur cell-free DNA : hématopoïèse clonale

Animateur : Jean-Baptiste Micol, Villejuif

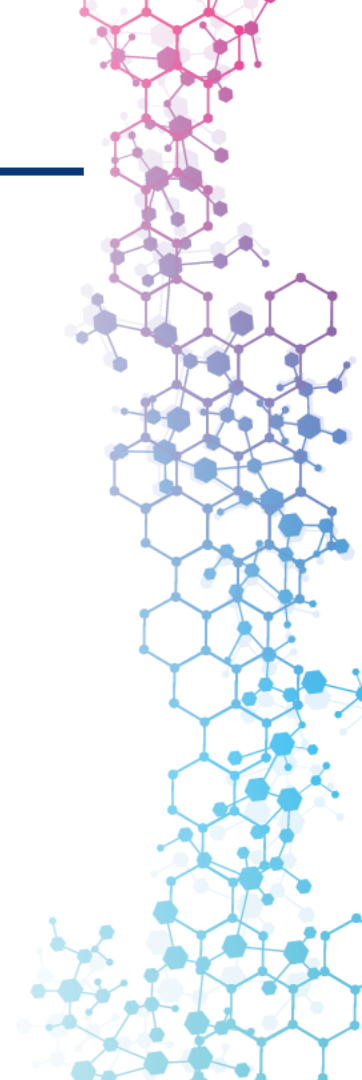
Modérateur : Karen Leroy, Paris



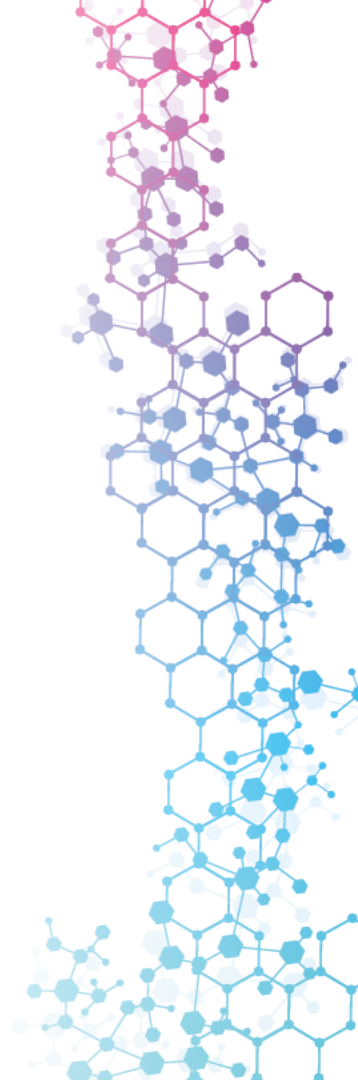
Liens d'intérêt

■ Jean-Baptiste Micol, Villejuif

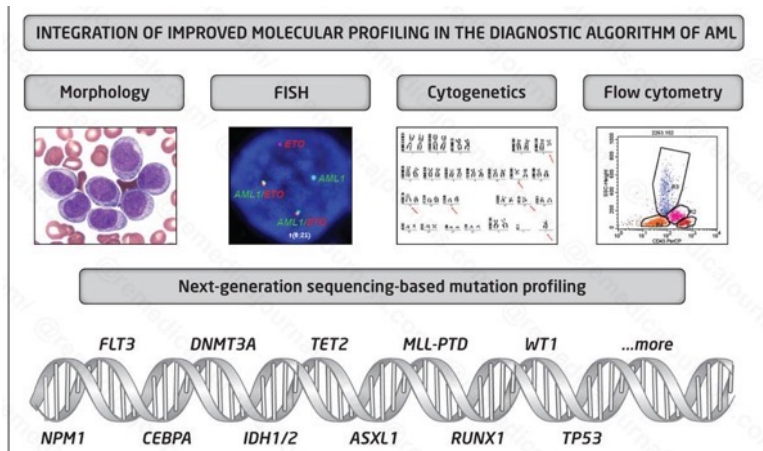
- Research Grant : Novartis; Jazz Pharmaceuticals
- Honoraria : Jazz Pharmaceuticals; AbbVie; Astellas; Astra Zeneca



CHIP DEFINITION

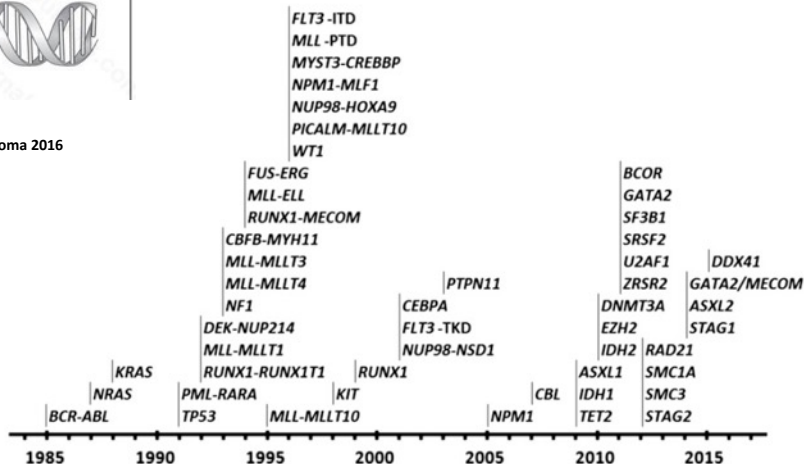


AML : Molecular characterization

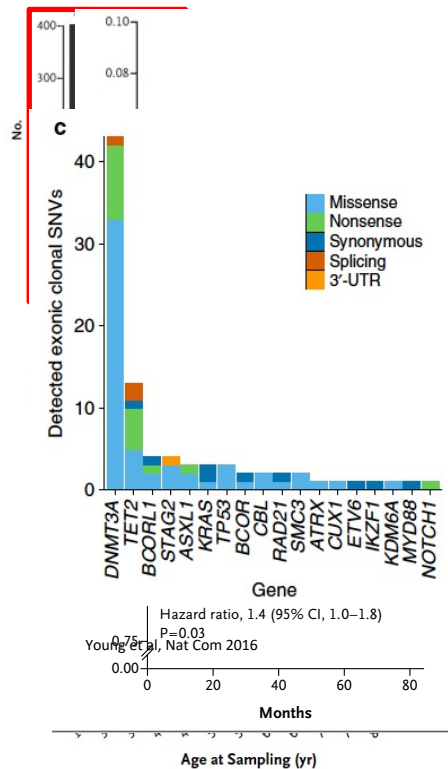


The Molecular Pathogenesis of Acute Myeloid Leukemia, K Tawana ert al, Leukemia lymphoma 2016

Gustave Roussy :
NGS Panel : 74 genes (C.Marzac)



Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) in healthy patients



- 10 % healthy adults > 65 years
- Somatic mutations : epigenetic regulators
- 10 times the risk of a hematologic cancer VAF > 10% (LNH/AML)
- Increase in all-cause mortality (including coronary heart disease, ischemic stroke)
- 95% of individuals studied (VAF 0.0003)

Clonal hematopoiesis (CHIP)

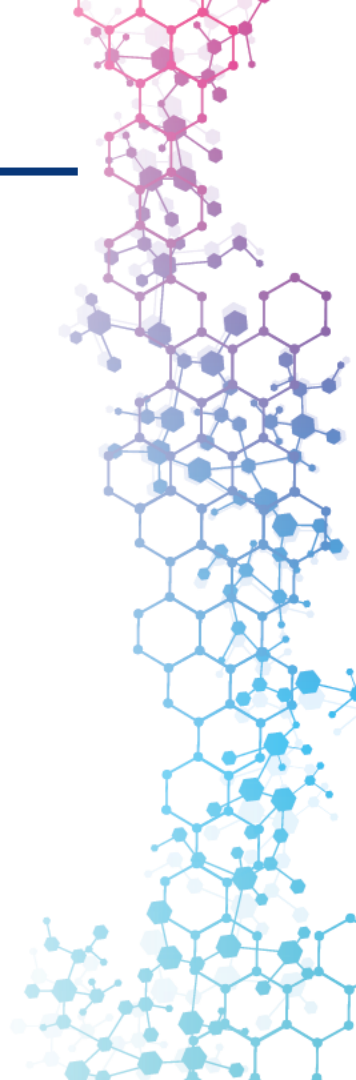
Critères de définition d'une CHIP

Séquençage par NGS

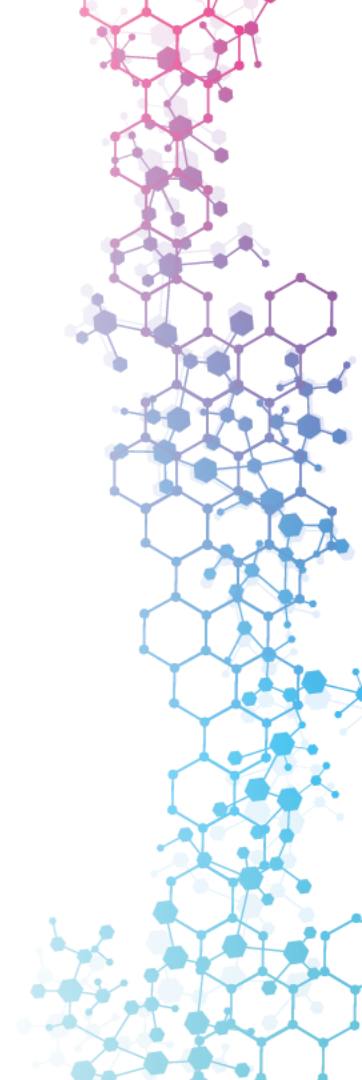
- Présence d'une ou plusieurs mutations habituellement associées aux pathologies hématologiques.
- VAF ou fréquence d'allèle muté $\geq 2\%$ dans le sang périphérique.

Démarche diagnostique hématologique complète

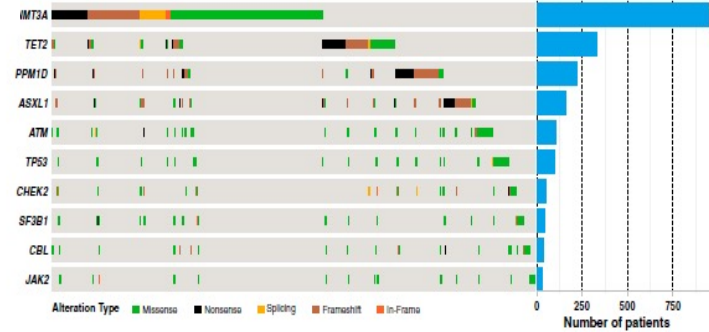
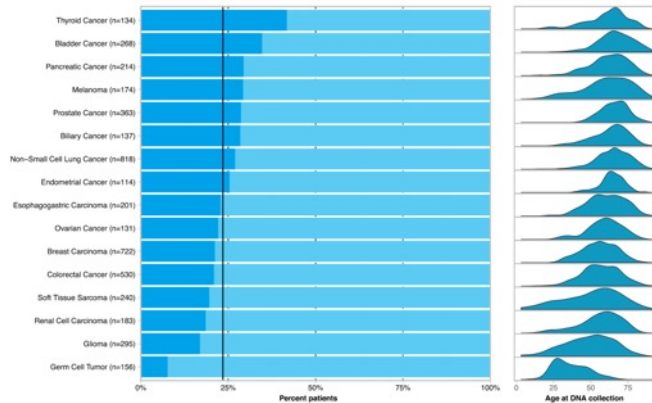
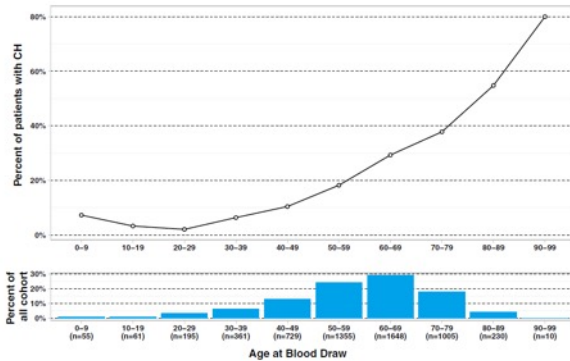
- Absence de pathologie hématologique ou d'autre maladie clonale.
- Absence de gammapathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), lymphocytose B monoclonale (MBL) ou hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN).



CHIP & Cancer



CHIP and Cancer

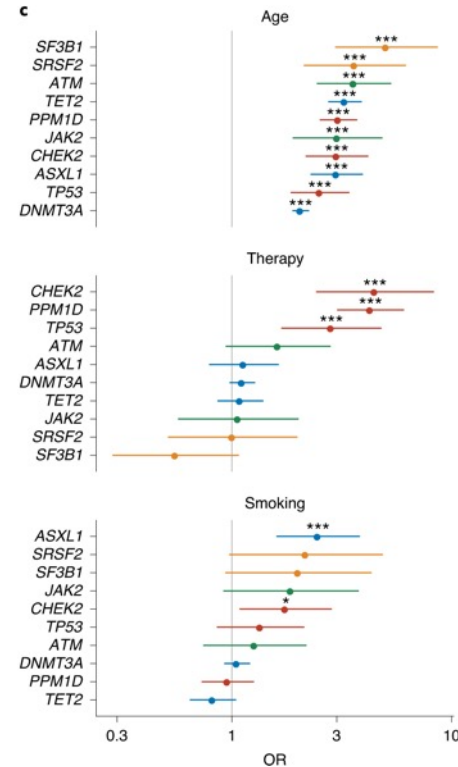
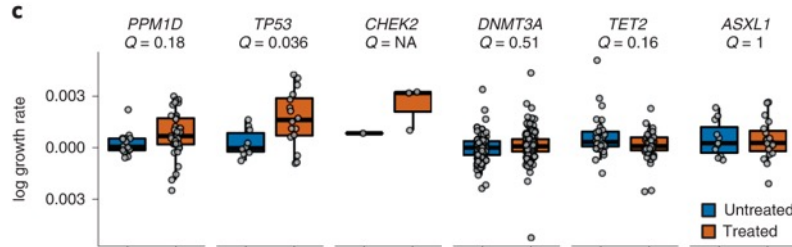


- 25% in cancer patients
- No associations across cancer categories
- ↗ *PPM1D/TP53* mutations
- Increased risk of hematologic cancers
- impacts survival from nonhematologic cancers

Cancer therapy shapes the fitness landscape of clonal hematopoiesis

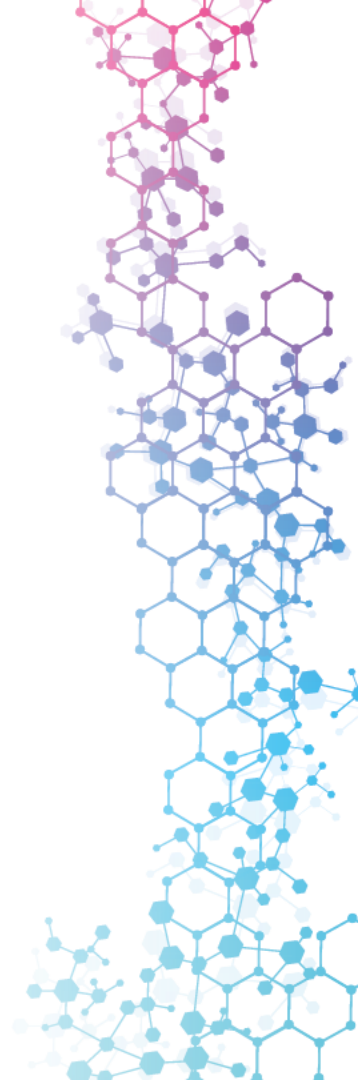
Mutations selected differentially based on exposures :

- ASXL1 Current or former smokers
- DNA damage response genes (TP53, PPM1D, CHEK2) :cancer therapy with radiation, platinum and topoisomerase II inhibitors



24,146 patients

CHIP & Biopsie(s)



CHIP and Cancer Biopsy

Detection of CHIP-associated alterations in comprehensive genomic profiling of solid tumor specimens (113 079 solid tumors)

npj | Breast Cancer

www.nature.com/npjbcancer
All rights reserved 2374-4677/15

ARTICLE OPEN

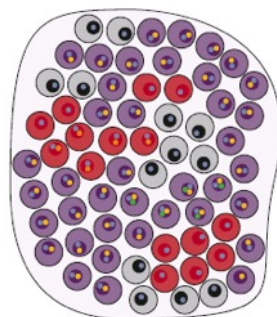
Somatic mutations in leukocytes infiltrating primary breast cancers

Marla Kleppe^{1,2}, Elizabeth Comen^{2,3}, Hannah Y Wen¹, Lennart Bastian¹, Brian Blum², Franck T Rapaport², Matthew Keller¹, Zvikia Granot², Nicolas Socci⁴, Agnès Viale⁵, Daoqi You⁶, Robert Benezra⁵, Bilita Weigelt^{1,2}, Edli Brogi¹, Michael F Berger^{1,2}, Jorge S Reis-Filho^{1,2}, Ross L Levine^{1,2} and Larry Norton²

Table 2. Somatic mutations in known cancer genes

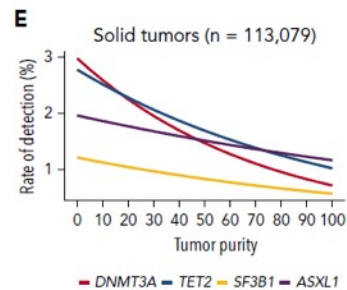
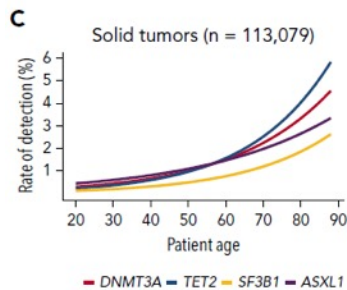
Sample	Gene	Mutation	Frequency
1	EP300	p.G1777C	0.06
2	DNMT3A	p.Y533C	0.185
3	EZH2	p.A483S	0.46
	TP53	p.M169I	0.029
4	BCOR	p.P1156L	0.49
	EPHA7	p.G592S	0.14
	WT1	p.T278I	0.11
	TET2	p.Q1702*	0.06
	EGFR	p.A871E	0.042
5	ALK	p.R1209Q	0.21
	ETV6	p.P25S	0.038
6	NOTCH2	p.P1101T	0.18
	NF1	p.Q2434H	0.099
	SMARCA4	p.D694E	0.087
12	TET2	p.E1874K	0.17

Mutations listed in this table were identified by targeted sequencing with an allele frequency of $\geq 10\%$. Mutations occurring at a lower frequency were included if previously reported in COSMIC.

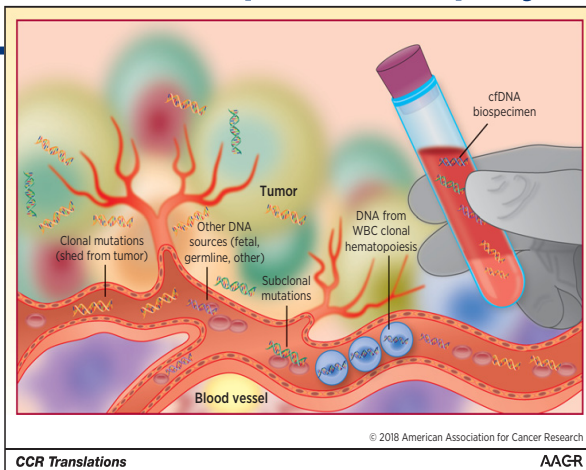


Tumor purity of 58%

- Non-tumor stromal cell; 19%
- Clone 1, mutated tumor cell; 51%
- Clone 2, mutated tumor cell; 7%
- Non-tumor hematopoietic cell; 15%
- Mutated non-tumor hematopoietic cell; 7%
- Heterozygous germline variant; VAF = 50%
- Heterozygous somatic variant; VAF = 29%
- Heterozygous somatic variant; VAF = 3.5%
- Heterozygous CHIP variant; VAF = 3.5%



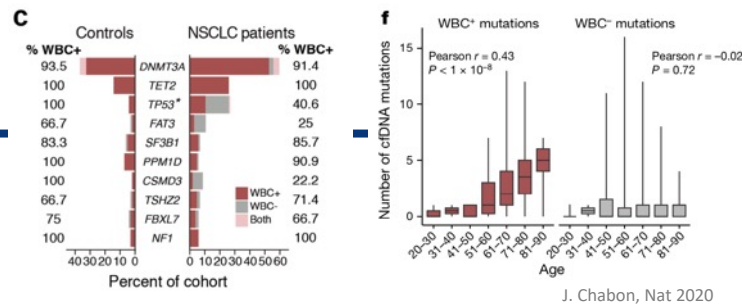
CHIP in liquid Biopsy



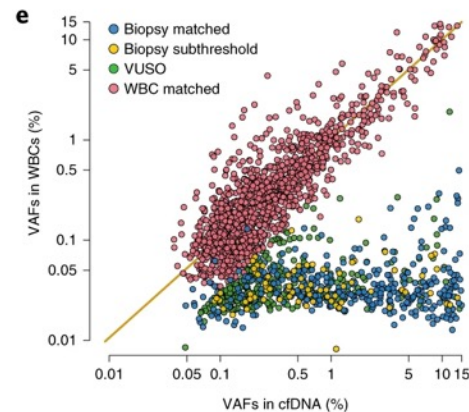
J Bauml, CCR 2018

JAK2 mutations, some *TP53* mutations, and rare *KRAS* mutations detected in cfDNA are derived from CH not tumor.

Hu Y, Ulrich BC et al..Clin Cancer Res 2018



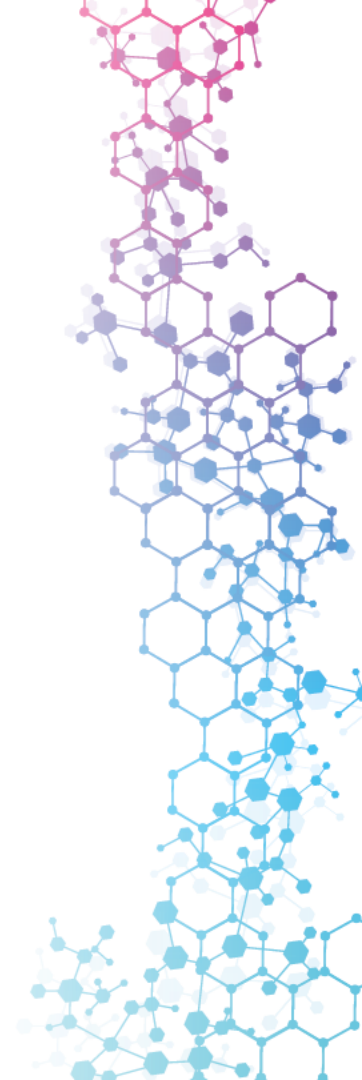
- Important to recognize CHIP as a possible cause of misattribution of mutation origin



P Razavi, Nat Med 2019

- VAFs of CHIP in blood samples correlated with CHIP in plasma samples

CAS CLINIQUE N°1



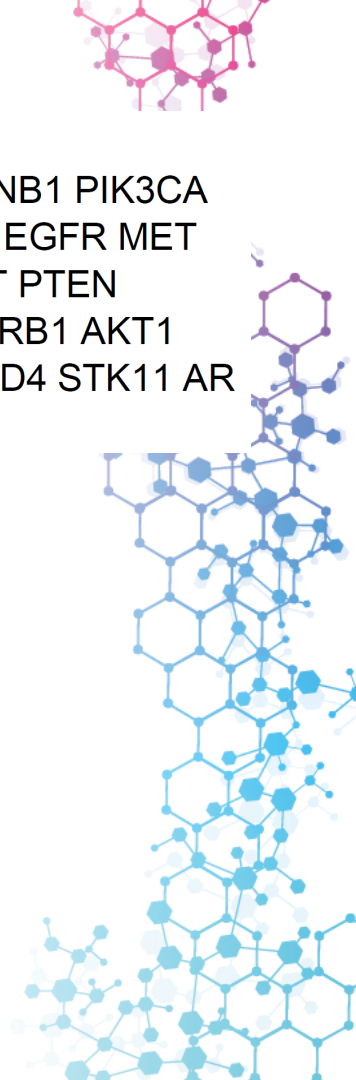
Patiente de 68 ans,
Cancer du sein carcinome canalaire infiltrant
4^{ème} ligne de traitement

Résultats :
TP53 A39fs*5 (0,21 %)
IDH2R140Q (5.4%)

Panel NGS niveau 1

NRAS ALK IDH1 IDH2 CTNNB1 PIK3CA
FGFR3 PDGFRA KIT ESR1 EGFR MET
BRAF FGFR1 CDKN2A RET PTEN
FGFR2 HRAS KRAS POLE RB1 AKT1
MAP2K1 TP53 ERBB2 SMAD4 STK11 AR

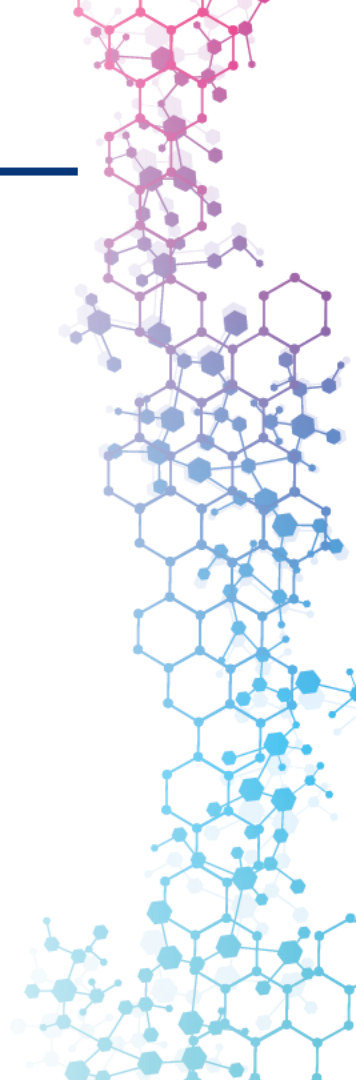
La patiente est éventuellement incluable dans un “basket trial” ouvert
aux patients atteints de cancer IDH mutes :
“Testing Olaparib and AZD6738 in IDH1 and IDH2 Mutant Tumors”



QUESTION

Que faites-vous ?

1. Prévoyez d'inclure le patient au plus vite dans ce protocole ?
2. Vérification de la présence des anomalies sur la biopsie tumorale ?
3. Vérifier NGS sur sang total ?
4. Vérification de la prise de sang ?



Suivi

■ NFS :

- 15800 GB dont 2500 monocytes (présent avant la rechute)
- 10,8 hg (aregenerative)
- 350 10⁹/l plaquettes

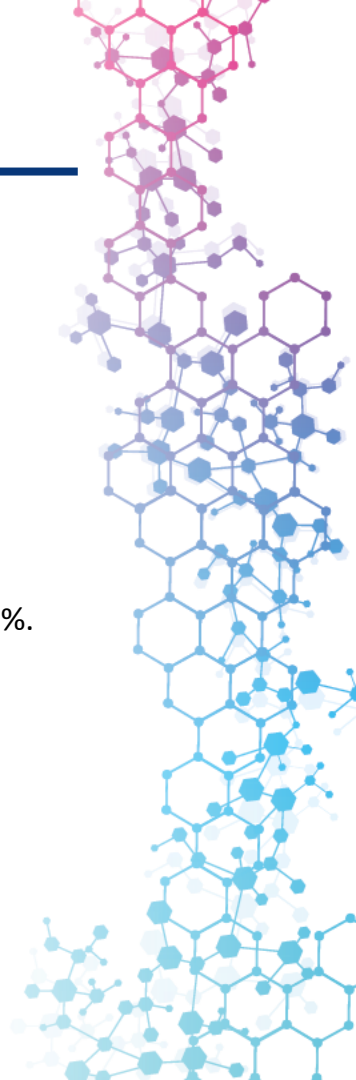
■ Myélogramme :

- Moelle de richesse augmentée, comportant des signes très marqués de dysérythropoïèse, et plus discrets des lignées granuleuse et mégacaryocytaire. Petit excès de cellules immatures estimé à 6%.

■ CONCLUSION

- Profil cytologique concordant avec une LMMC1

■ NGS confirme l'existence de la mutation *IDH2* + mutation *ASXL1* 25% et *SRF2* VAF 27%



Spectre des mutations IDH

Mutations *IDH1&2* : certains type de cancers solides +
Pathologies hématologiques LAM/MDS/LMMC

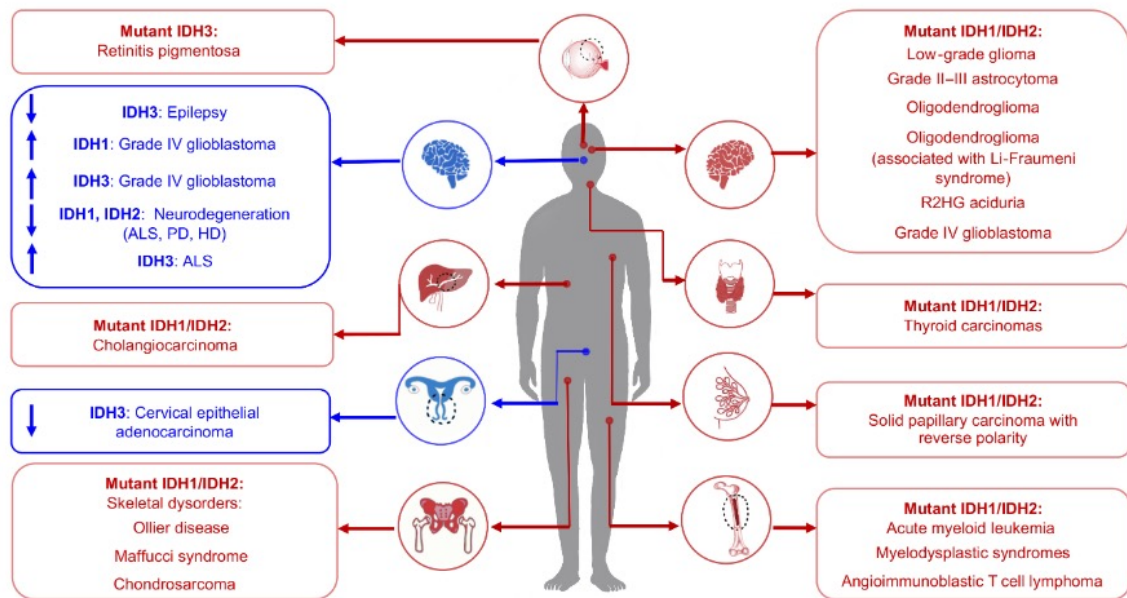


Fig. 2. Deregulation of IDH enzymatic activity is associated with human disease. Upward or downward pointing arrows indicate overexpression or downregulation of wild-type IDHs (shown in blue), respectively.

Mauvaise orientation thérapeutique

JAMA Oncology | Brief Report

Association of Clonal Hematopoiesis in DNA Repair Genes With Prostate Cancer Plasma Cell-free DNA Testing Interference

Kendal Jensen, MD, PhD; Eric Q. Konnick, MD; Michael T. Schweizer, MD; Alexandra O. Sokolova, MD; Petros Grivas, MD, PhD; Heather H. Cheng, MD, PhD; Nola M. Klemfuss, MHA; Mallory Beightol, BS, MB; Evan Y. Yu, MD; Peter S. Nelson, MD; Bruce Montgomery, MD; Colin C. Pritchard, MD, PhD

10% had CHIP variants used for US FDA approved indications of PARPi treatment

Table. CHIP Clones Detected in DNA Repair Genes Used for PARPi Eligibility

Age, y	Gene ^a	CHIP Variant(s)	VAF cfDNA	VAF blood control	Notes
81	ATM	p.R3008C, p.E3007D	16%; 5%	16%; 5%	CHIP hotspot, reported by outside lab in bone marrow
54	ATM	p.S305*	2%	3%	
82	ATM	p.G2891D	12%	13%	Kinase domain
81	ATM	c.2921 + 1G>A	78%	65%	Not germline based on tumor testing
87	ATM	p.L2492R	7%	9%	CHIP hotspot
76	BRCA2	p.T3310Nfs*17	3%	3%	Reported by outside lab, recommending PARPi
74	CHEK2	p.P426H	19%	18%	Kinase domain

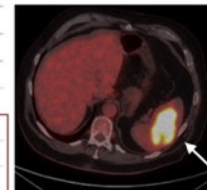
2014 : stage IV bladder carcinoma with liver metastases (platinum plus gemcitabine) :CR1

2015 lung progression, atezolizumab : CR2

2021, isolated splenic nodules CT-scan suspicion of relapse.

Molecular profiling of ctDNA :
CREBBP gene (P874fs*4 and Q200*)
NOTCH2 gene (Q2389*)
Suspicion of lymphoma.

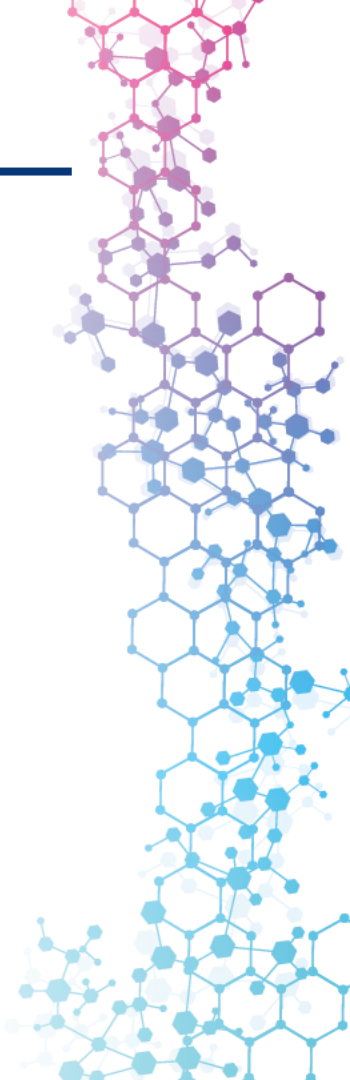
HISTORIC PATIENT FINDINGS		ORD-1040943-01 VAF%
Blood Tumor Mutational Burden		8 Muts/Mb
Microsatellite status		MSI-High Not Detected
Tumor Fraction		38%
ATM	● F1174fs*6	65.3%
NRAS	● G13C	10.9%
CREBBP	● P874fs*4	13.1%
	● Q200*	40.9%
NOTCH2	● Q2389*	45%
TP53	● N239D	37.3%



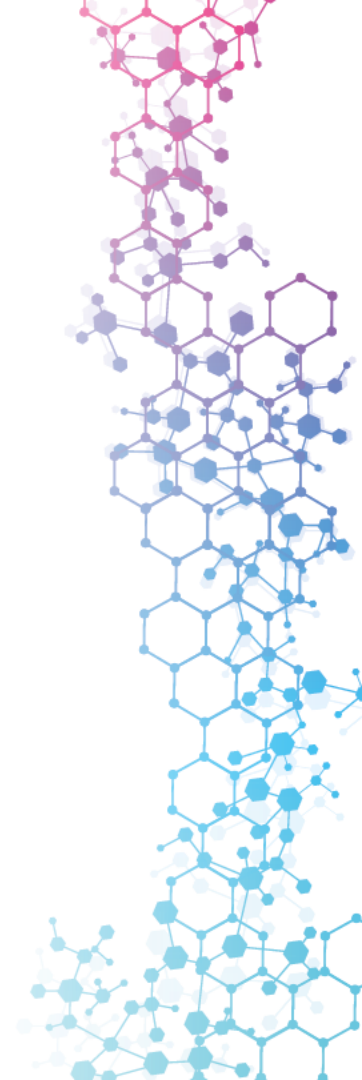
Splenectomy : non-germinal center large B cell lymphoma
Patient started R-CHOP regimen.

TAKE HOME MESSAGE

- Ne pas sur interpréter des résultats de biopsies liquides !
- Résultats en accord avec la pathologie
- Ne pas mésestimer d'autres diagnostics : Hémopathies (IDH, JAK2 ...) ou autre cancer



CAS CLINIQUE N°2



Patient 52 ans
Adénocarcinome bronchique
OMS actuel : 0
Métastatique : Oui

Traitements
Nombre de lignes de traitement antérieures : 3

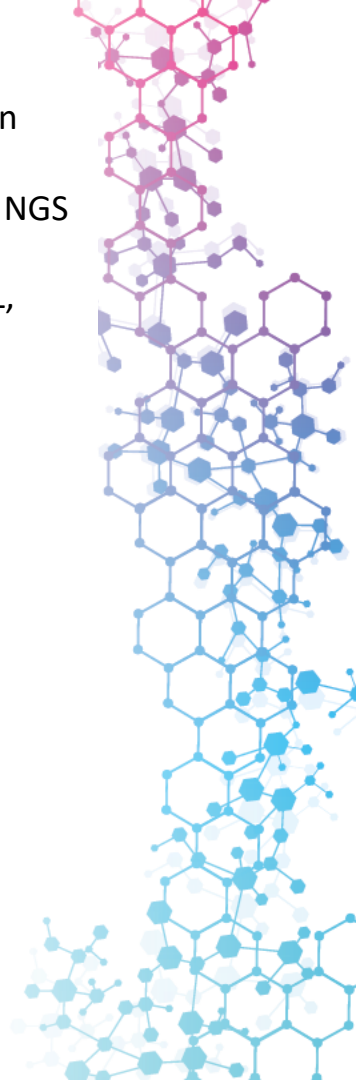
Mutation identifiée sur la tumeur :
EGFR exon 21

Protocole : FMI liquide
Panel : Foundation One Liquid CDx
Site biopsie : sang

TET2 Q910* (0,75 %), R123fs*5 (0,78 %)
DNMT3A W330 (0,52%)
TP53 H214fs*4 (0,30 %)

FoundationOne Liquid Biopsy :
Panel de 311 gènes mutés de façon
récurrente en oncologie

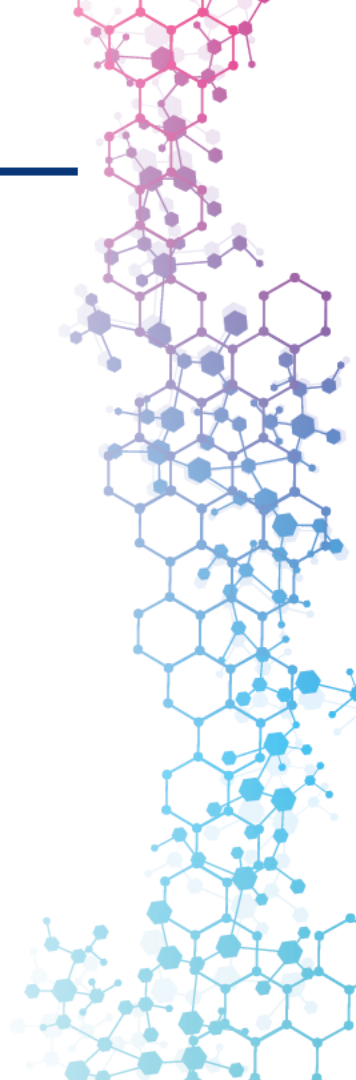
- 33 gènes présents sur le panel NGS myéloïde
- 10 gènes récurrents (JAK2, MPL, ASXL1, DNMT3A, TET2, U2AF1, SF3B1, IDH1, IDH2, TP53)



QUESTION

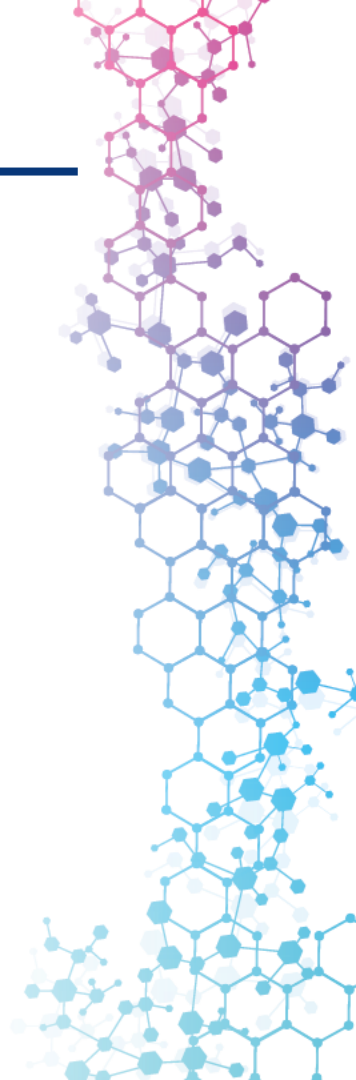
Que concluez-vous ?

1. Proposition d'un essai spécifique sur une de ces anomalies ?
2. Confirmer l'existence de ces mutations sur la biopsie tumorale ?
3. Refaire la biopsie liquide ?
4. Prévoir une consultation hématologique ?



Suivi

- Mutation connue non retrouvées sur la biopsie liquide (EGFR exon 21)
- Probable échec de biopsie liquide
- Mutations somatiques présentes probablement d'origine hématopoïétique, à ses seuils très bas (<2%), incidence de CHIP élevée dans la population générale
- Qui adresser à un hématologue ?
-



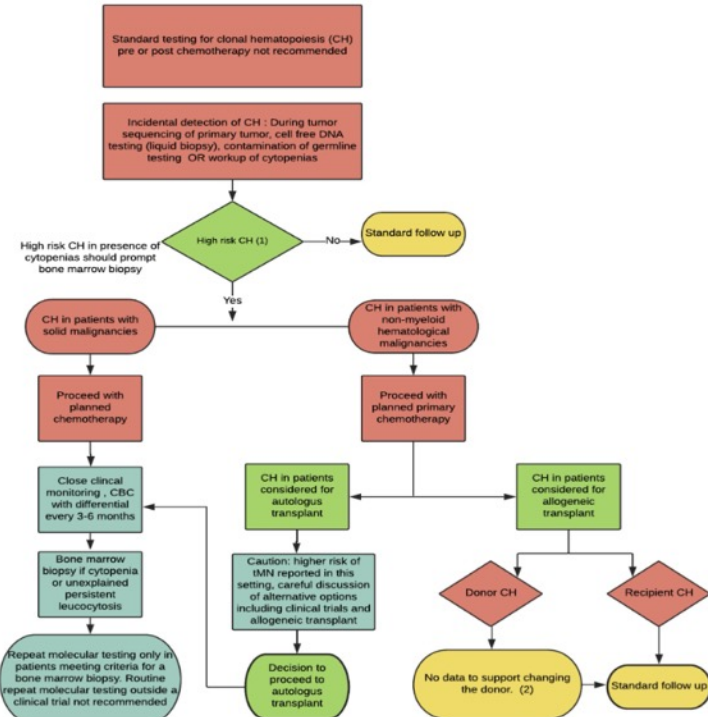
CHIP à Haut risque : Recommandations

Les patients à haut risque sont définis par :

- Présence de mutations associées à un haut risque de therapy related myeloid neoplasms ou connues pour avoir une expansion clonale post chimiothérapie, (*TP53*, *PPM1D*, *DNMT3A R882H*)
- Fréquence allélique supérieure à 10 %
- Présence de plusieurs mutations CHIP

P. Desai and G.J. Roboz

Best Practice & Research Clinical Haematology 32 (2019) 13-23



TAKE HOME MESSAGE

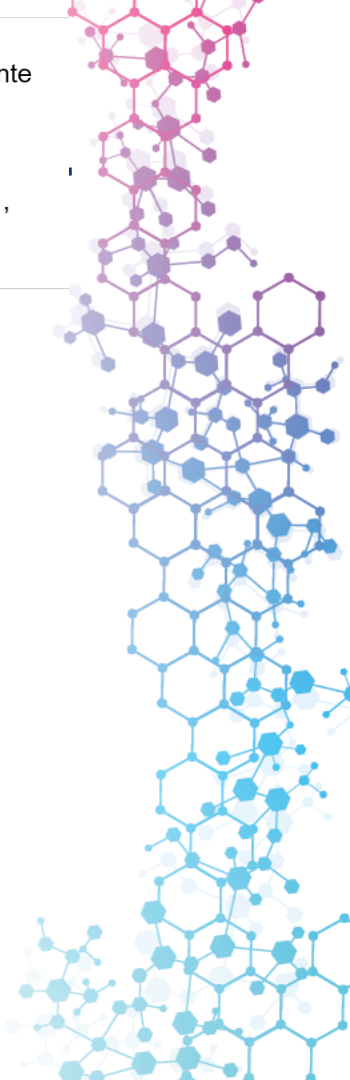
FoundationOne Liquid Biopsy :
Panel de 311 gènes mutés de façon récurrente en oncologie

- 33 gènes présents sur le panel NGS myéloïde
- 10 gènes récurrents (JAK2, MPL, ASXL1, DNMT3A, TET2, U2AF1, SF3B1, IDH1, IDH2, TP53)

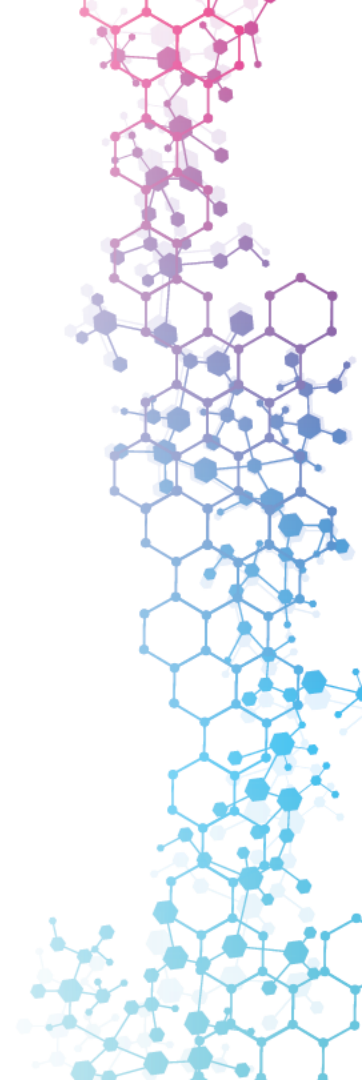
- **Attention aux faux négatifs**
- **Pas de suivi systématique des hématopoïèses clonales !**

Recommandations Gustave Roussy :

- **Cytopénies ou monocytose inexpliquées ($Hg < 10 \text{ g/dl}$, et/ou $pq < 100 \text{ G/l}$, et/ou $PNN < 1 \text{ G/l}$ et/ou $Mono > 1 \text{ G/l}$)**
- **Mutation JAK2 quelque soit la VAF + Thrombocytose ou polyglobulie ou monocytose**
- **Patients avec survie potentielle > 6 mois**
 - Mutation récurrente isolée VAF > 10% surtout si cytopénies/monocytose
 - Association de mutations récurrentes (>1) avec VAF > 2% surtout si cytopénies/monocytose
 - Mutation « actionnable » avec doute sur l'origine mutationnel (« Hémato » ou « Onco ») et impossibilité de vérifier sur la tumeur, si VAF > 1 % pour NGS sur sang total



CAS CLINIQUE N°3



Femme de 68 ans

Pas d'ATCD

Juin 2015 : Adenocarcinome endometrioïde de l'ovaire métastatique traité par débulking et 6 cures de chimiothérapie CARBOPLATINE-TAXOL adjuvant.

Juin 2017 : Récidive péritonéale

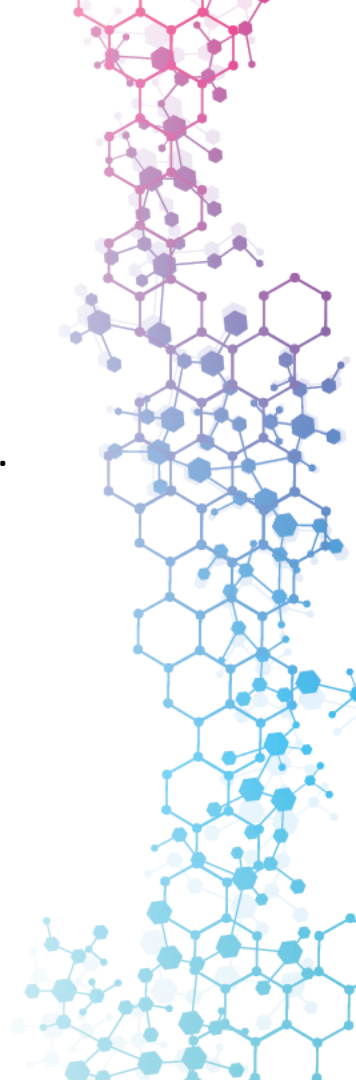
CA 125 était à 200 U/ml à la rechute.

Biopsie : mutation de l'exon 5 du gène TP53, c.524 G>A ; p.Arg175His.

Fréquence allélique 66%

Proposition de protocole expérimentale avec Suivi en de la MRD sur TP53

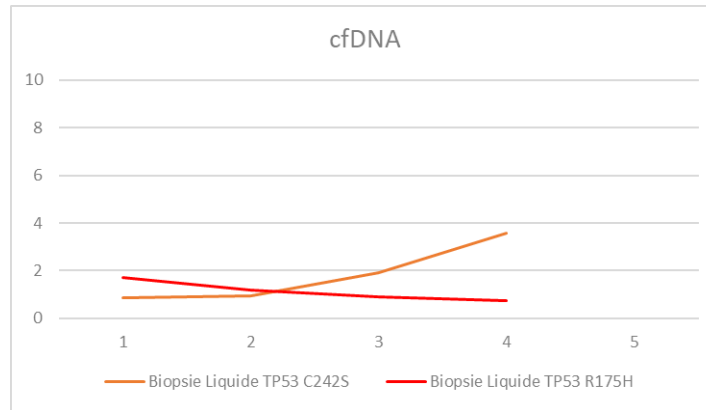
Traitement CARBOPLATINE TAXOL quatre cures.



Suivi

Le Pet-scanner réalisé au décours de C4 montre une réponse métabolique complète.
Anémie macrocytaire Grade 1

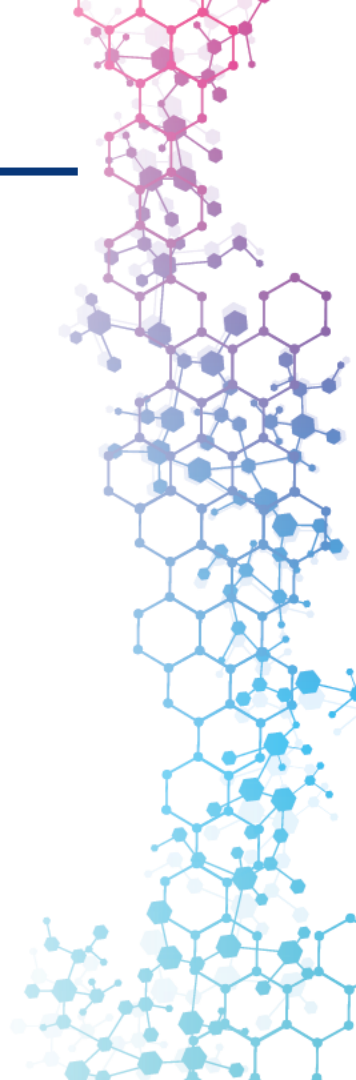
Suivi des mutations TP53 de l'ADN tumoral circulant : Réponse dissociée
Disparition du clone TP53 R175H, apparition d'un clone TP53 C242S



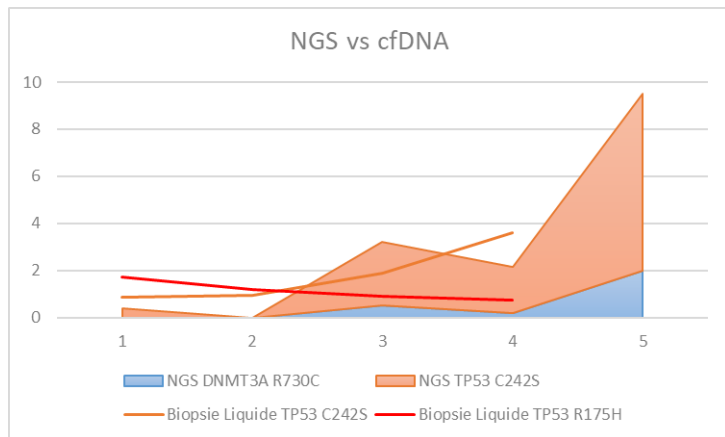
QUESTION

Quelles sont vos hypothèses ?

1. Echec de traitement ?
2. Clone de résistance tumorale ?
3. CHIP ?
4. Hémopathie sous jacente ?



Explorations



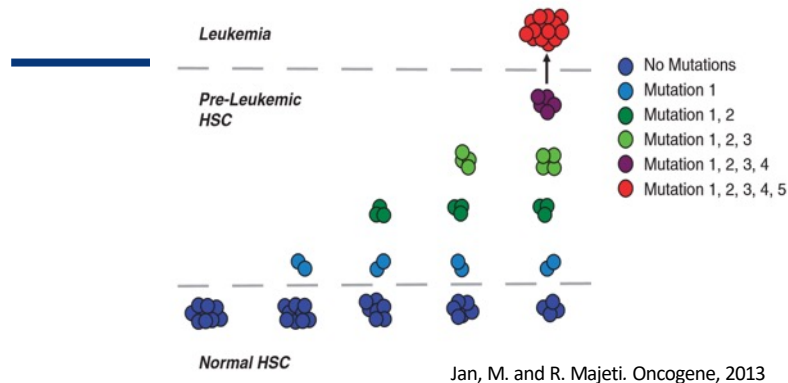
Exploration de son anémie n'a pas mis en évidence d'hémopathie

NGS moelle retrouve la mutation TP53 C242S ainsi qu'une mutation DNMT3A mais pas de mutation TP53 R175H

Dans ce contexte, il est décidé de ne pas opérer et de poursuivre la chimiothérapie par CARBOPLATINE / TAXOL avec un traitement d'entretien.

Suivi hématologique établie (surveillance car CCUS)

CHIP/AML un continuum ?

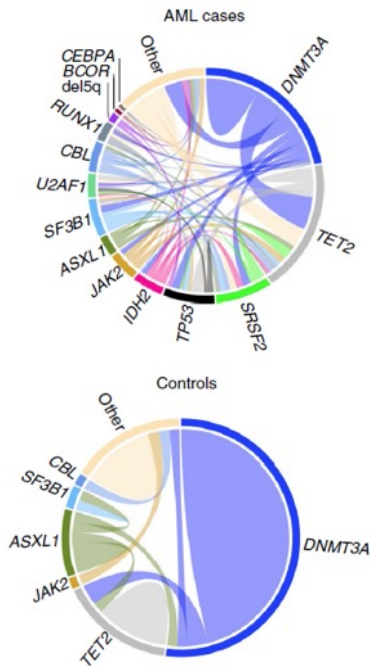


- **MDS** : Myelodysplastic Syndrom
- **ICUS** : Idiopathic Cytopenias of Undetermined Significance
- **IDUS** : Idiopathic Dysplasia of Undetermined significance
- **CHIP** : Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential

	Traditional ICUS		MDS by WHO 2008	
	'Non-clonal' ICUS	CHIP	CCUS	
			Lower Risk MDS	Higher Risk MDS
Clonality	-	+	+	+
Dysplasia	-	-	+	+
Cytopenias	+	-	+	+
BM Blast %	< 5%	< 5%	< 5%	< 19%
Overall Risk	Very Low	Very Low	Low (?)	Low
Treatments	Obs/BSC	Observation	Obs/BSC/GF	Obs/BSC/GF
			IMiD/IST	HMA/HCST

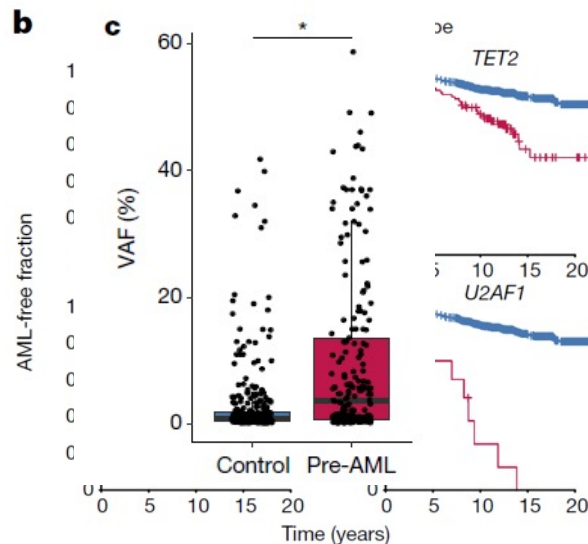
Clonal Cytopenias

CHIP & AML PREDICTION



- AML demonstrated greater clonal complexity than controls

Pinkal Desai *et al*, Nat Med 2018



- Higher variant allele frequencies
- IDH2, TP53 and RUNX1 mutations almost always predictive of development of AML.

Sagi Abelson *et al*, Nature 2018

TAKE HOME MESSAGE

- TAKE HOME MESSAGE 1 & 2 !
- Impossible de différencier des mutations TP53 « hémato » vs « onco »
- Cs Hémato surtout si cytopénies
- En cas de doute sur l'origine mutationnel (« Hémato » ou « Onco ») et impossibilité de vérifier sur la tumeur, si VAF > 1 % pour NGS sur sang total



MERCI DE VOTRE ATTENTION

