Marqueurs non invasifs en oncologie

Dr H. Paridaens (CHR Citadelle – Liège – Belgique)

Médecin biologiste

Labo CITA CHR Liège

LABORATOIRE D'ANALYSES MEDICALES

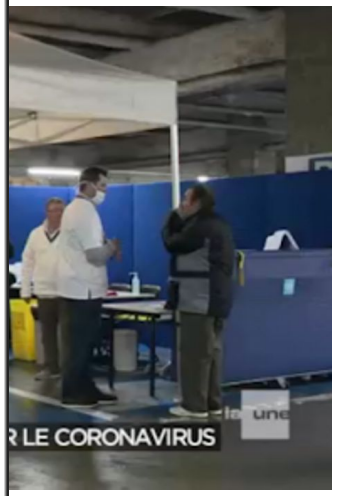
CHR CITADELLE LIEGE

1898

Vu à la Télé

BIO MED 2021

CNN World



What Does Broad Access to ctDNA Panel Testing Mean to Patients? – A Case Study

Carla's story:

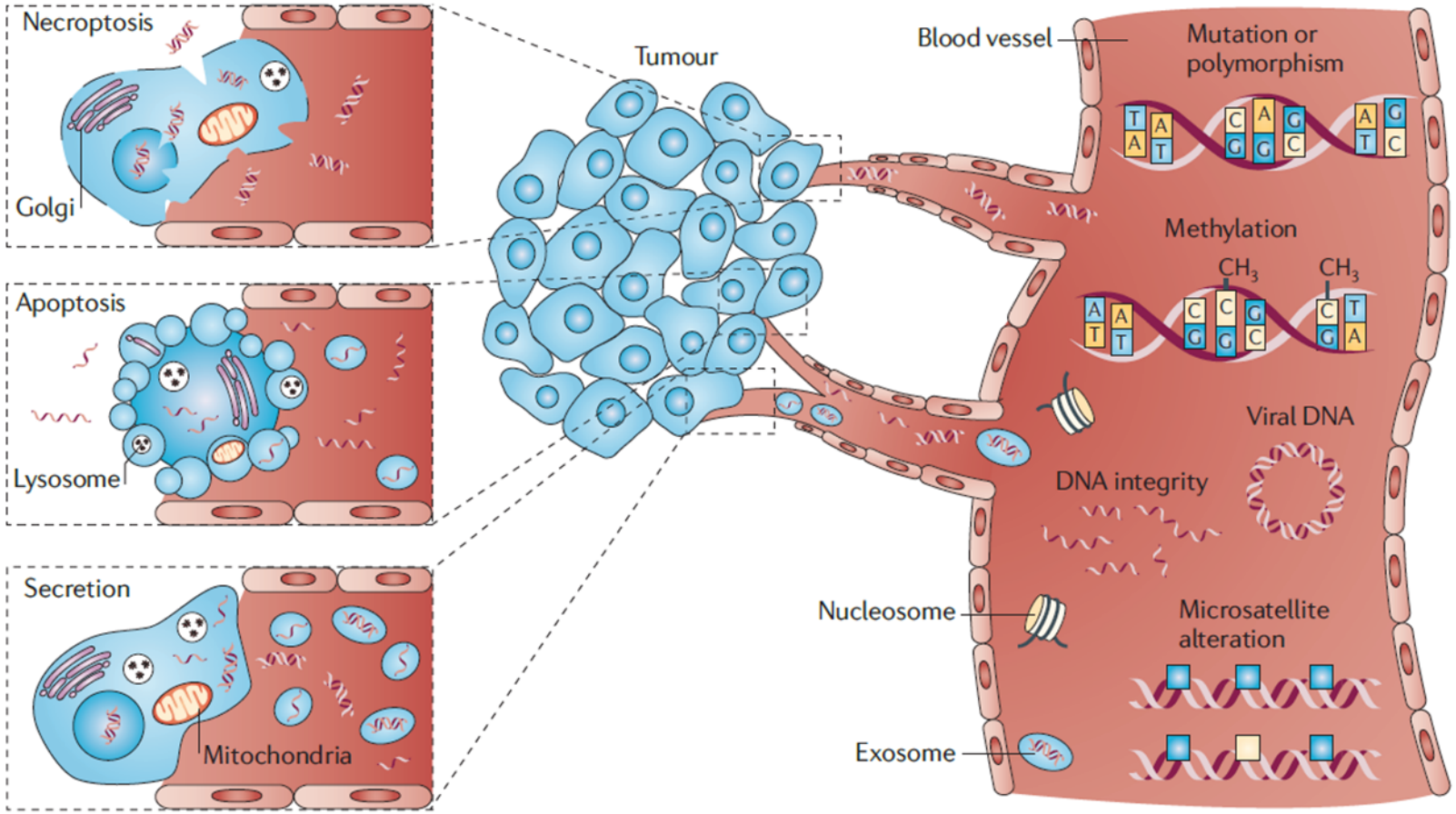
- Lives in a small, rural town; diagnosed with cancer two years ago.
- Cancer advanced; chemotherapy caused multiple complications
- "… I kept praying and pushing my doctors for other options. What can we do to prolong my life, what else can I try?"
- Her oncologist was not aware of clinical-grade ctDNA testing.
- Carla called her oncologist who was on vacation. She ended up talking with an oncologist at UHN who suggested Follow It.
- Carla was tested; results indicated targeted therapy.
- If not for luck, Carla would not have had best-in-class therapy.

Project ACTT

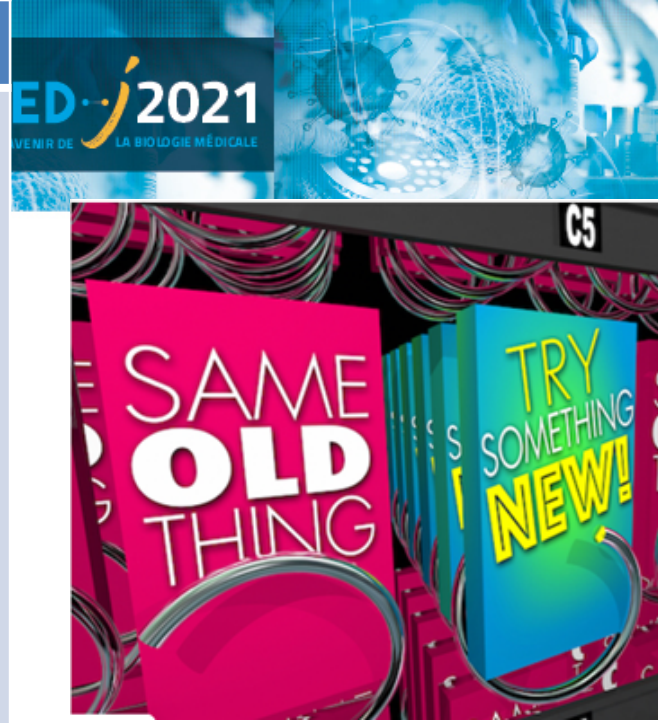
Access to Cancer Testing & Treatment in Response to Covid-19

Canexia Health

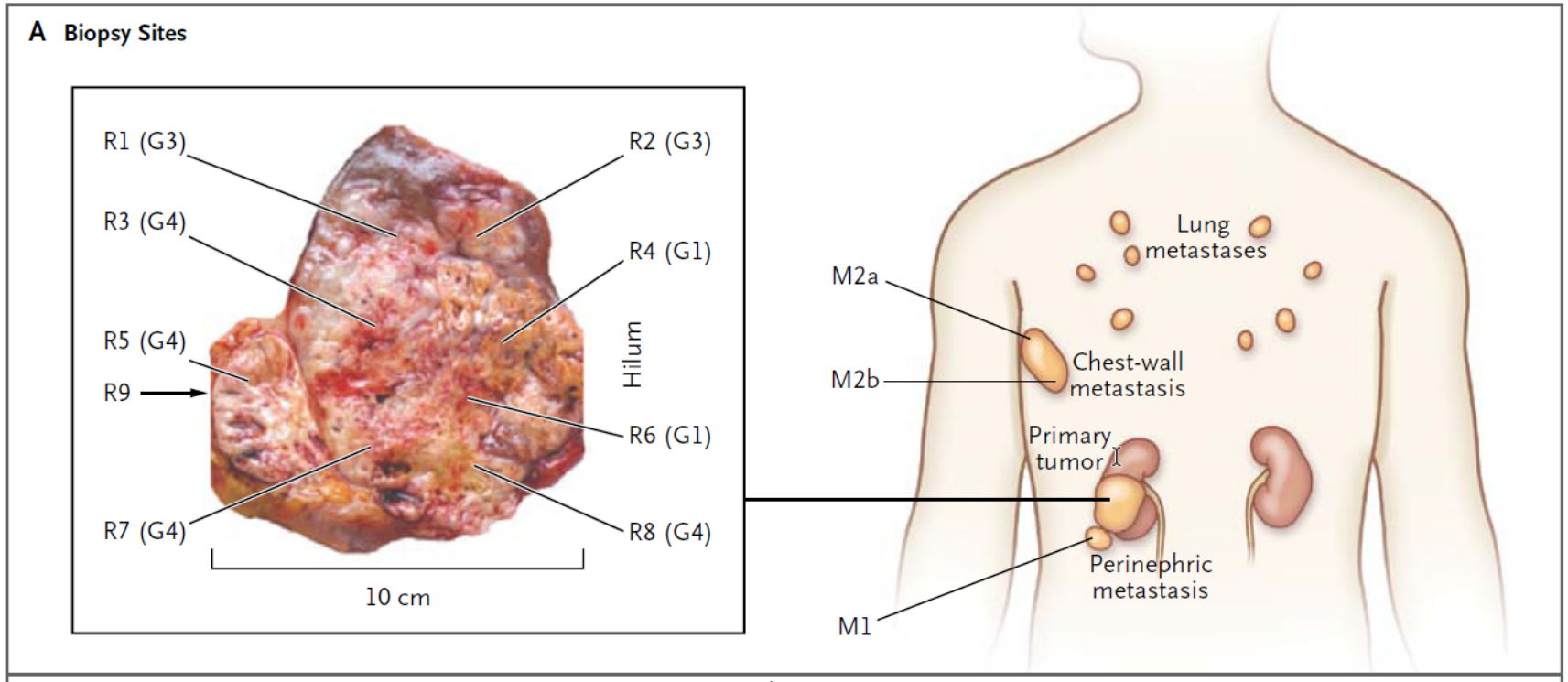
- Goal: **Reduce the burden on the Canadian Health System caused by COVID-19 by deploying ctDNA (liquid biopsy) testing for cancer patients**
  - As an alternative to tissue biopsies which are currently being cancelled or delayed
- Key deliverables include:
  - Provide 2,000 no-cost ctDNA tests equitably to all Canadian patients with metastatic or relapsed lung, breast or colorectal cancer to guide the treatment of targeted therapies.

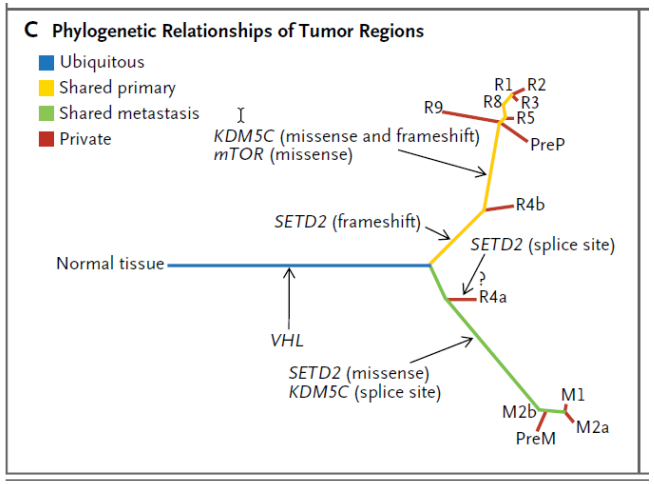

Necroptosis
Golgi
Apoptosis
Lysosome
Secretion
Mitochondria
Tumour
Blood vessel
Mutation or polymorphism
Methylation
CH_3
CH_3
Viral DNA
DNA integrity
Nucleosome
Microsatellite alteration
Exosome

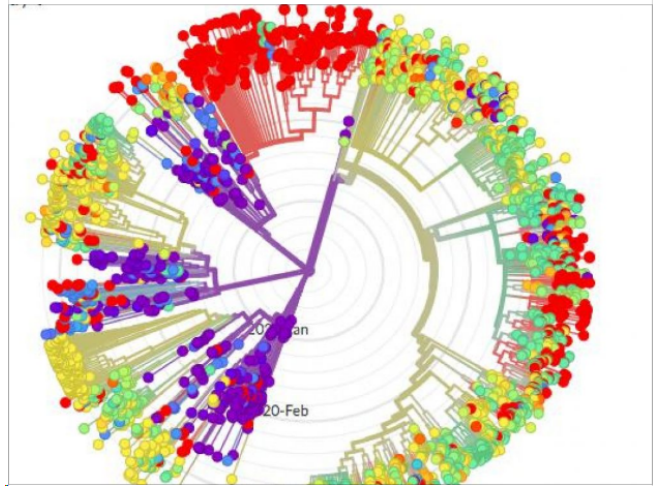
Biopsie tissulaire	Biopsie liquide
• Identifie le type de cancer • Donne des informations moléculaires à propos de la tumeur **Cependant …** • Risques (ex: biopsie hépatique → problème coagulation/ biopsie pulmonaire → pneumothorax) • Time consuming • Cher • Limité principalement à une lésion (quid **hétérogénéité** tumorale ?) • Certaines tumeurs ne sont pas accessible à la biopsie • La quantité de tissu peut être non suffisante	• Donne des information à propos de la **dynamique** de la tumeur (réponse au traitement et/ou progression) • Informations **pronostiques** • Non invasive • Non douloureuse • Ne requiert pas de chirurgie • Réduit les coûts • Réduit le délai du diagnostic • … **Cependant …** • Pas encore validé

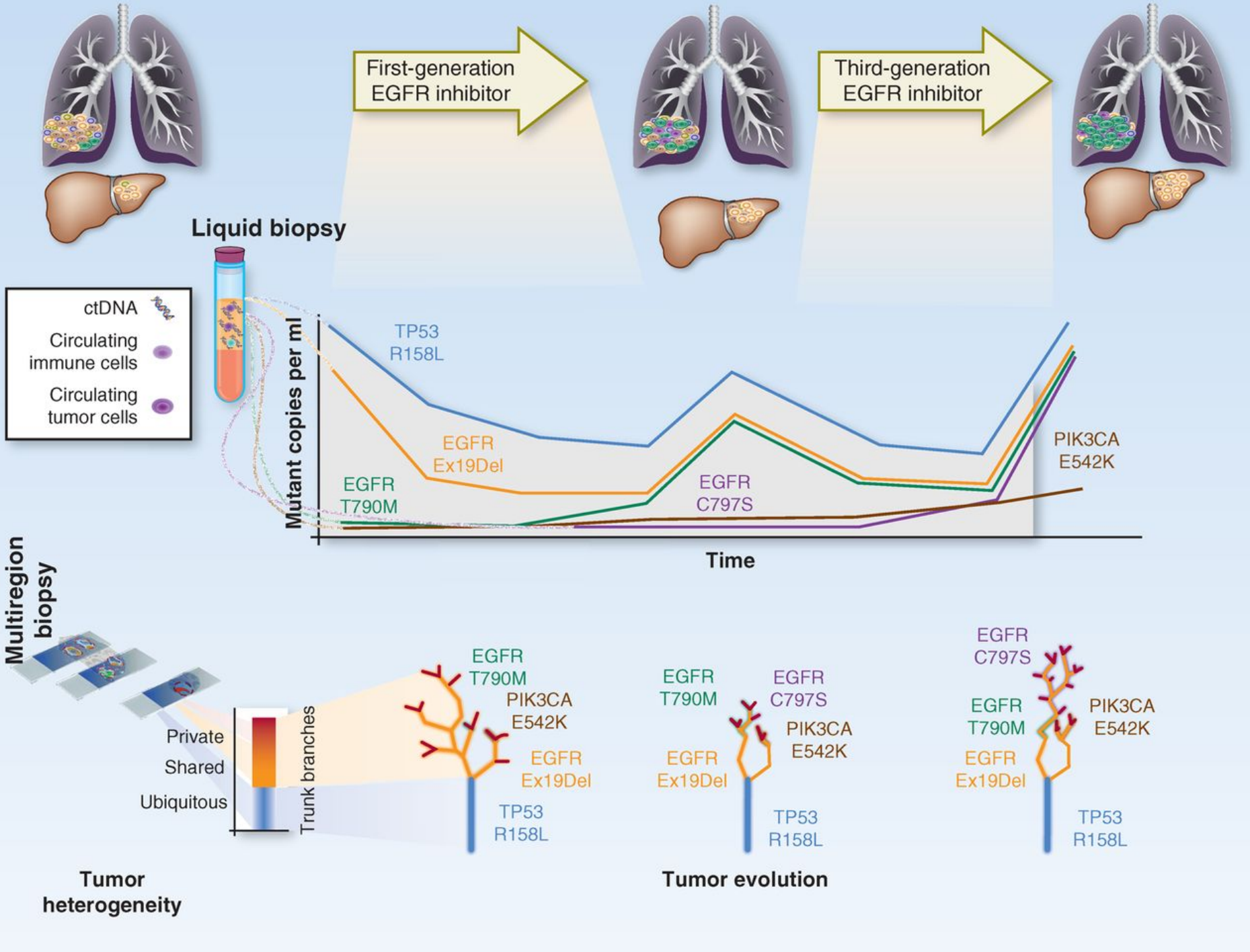


Hétérogénéité tumorale

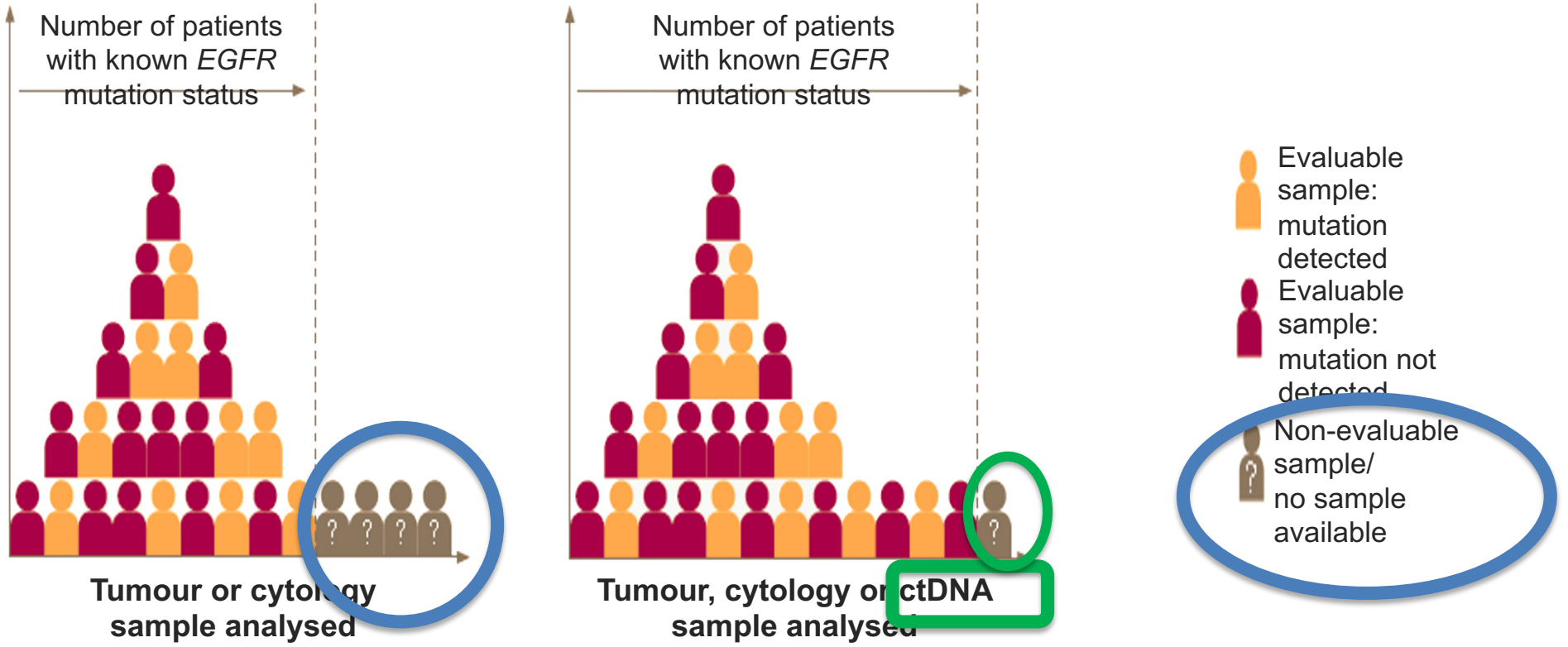






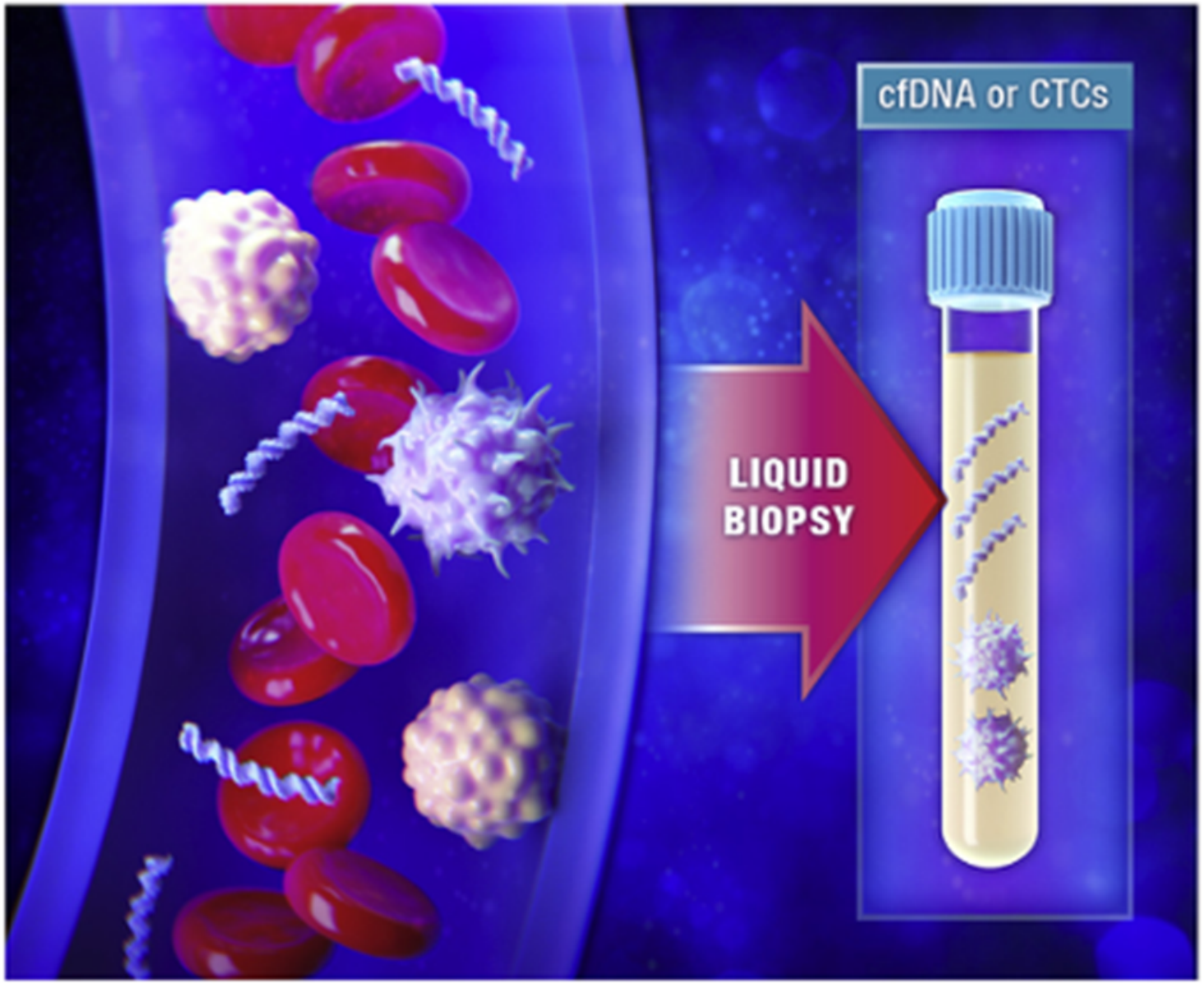

First-generation EGFR inhibitor
Third-generation EGFR inhibitor
Liquid biopsy
ctDNA
Circulating immune cells
Circulating tumor cells
Mutant copies per ml
TP53 R158L
EGFR Ex19Del
EGFR T790M
EGFR C797S
PIK3CA E542K
Time
Multiregion biopsy
Private
Shared
Ubiquitous
Trunk branches
EGFR T790M
PIK3CA E542K
EGFR Ex19Del
TP53 R158L
EGFR T790M
EGFR C797S
PIK3CA E542K
EGFR Ex19Del
TP53 R158L
EGFR C797S
EGFR T790M
PIK3CA E542K
EGFR Ex19Del
TP53 R158L
Tumor heterogeneity
Tumor evolution

Biopsie liquide : méthode ADNct complémentaire aux biopsies tissulaires



Note: *EGFR* mutation frequencies may vary depending on patient population.

Applications cliniques de la biopsie liquide



DIAGNOSIS:

Genotyping cfDNA in the blood to determine the tumor profile

RESPONSE AND FOLLOW UP:

Analysis of cfDNA and CTC for real time monitoring of response to treatment

TUMOR EVOLUTION:

Emergence of molecular alterations associated with resistance to therapy

MINIMAL RESIDUAL DISEASE:

The presence of cfDNA or CTC in the circulation indicates that the disease is still present

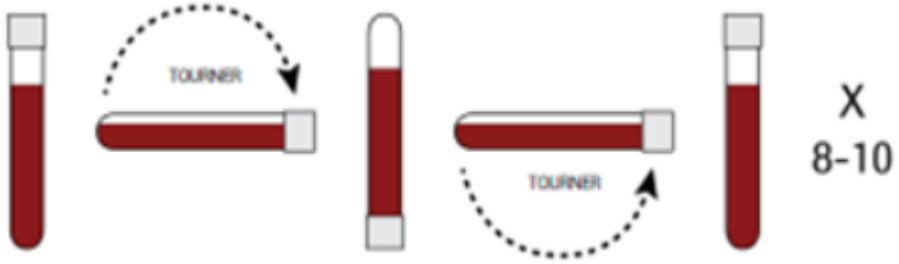
Avantages de la biopsie liquide

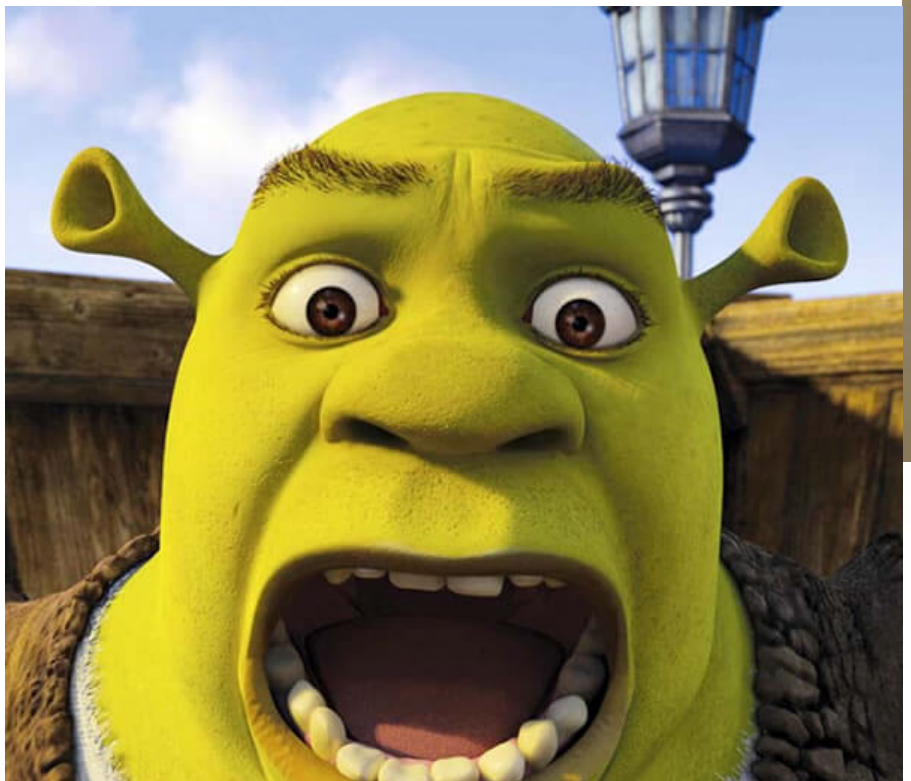
- Minimalement invasif
- Rapide
- Facile
- Utilisation des données issues des analyses de biopsie liquide pour :
  - Détection des mutations
  - **Monitoring thérapeutique** car les biopsies tumorales répétées ne sont pas une option

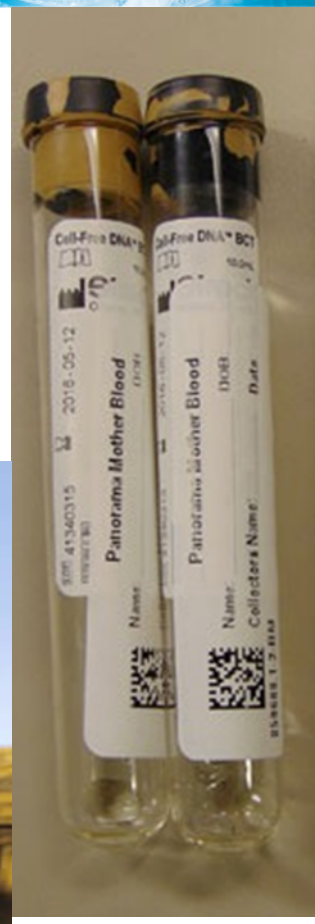
- **Accessible aux laboratoires de biologie clinique !**

Considérations pré-analytiques

- Effectuer le prélèvement avec les tubes adéquats
- Agiter immédiatement le tube délicatement 8 à 10 fois

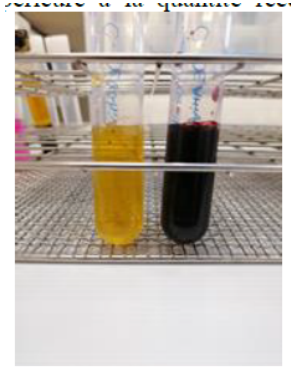


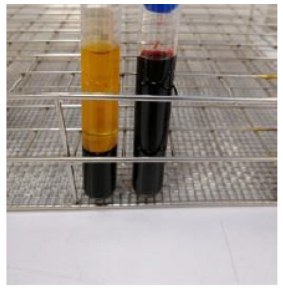




Considérations pré-analytiques

- Influence de l'hémolyse





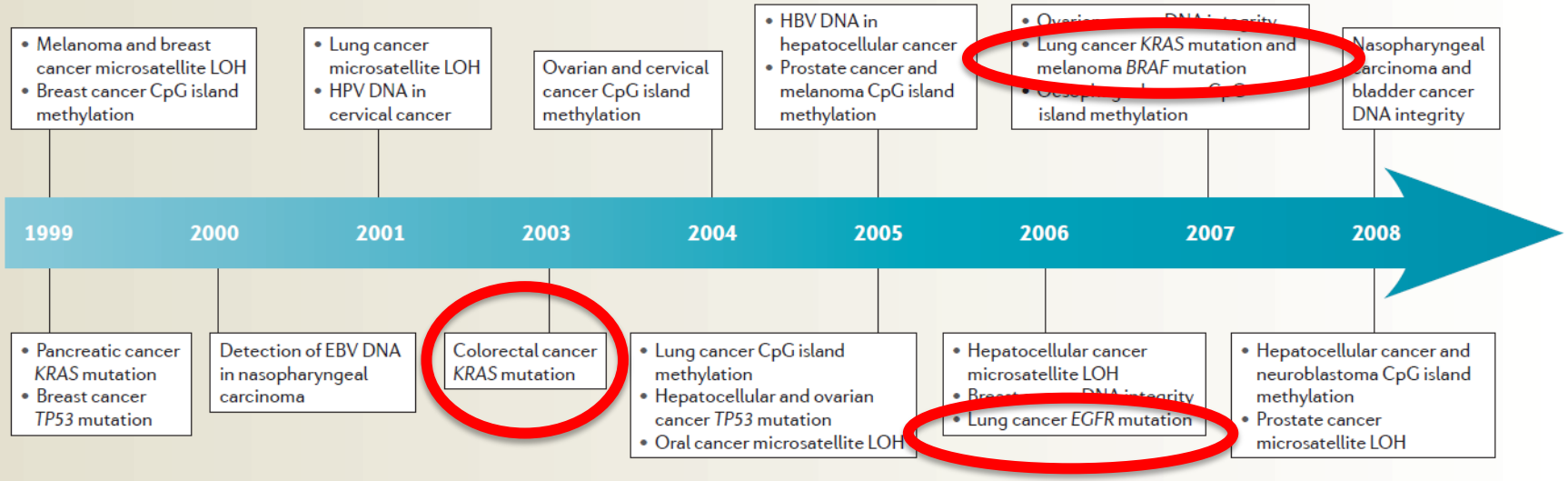
2/

Contamination ADN circulant par ADN des WBC lors de l'hémolyse → leucolyse

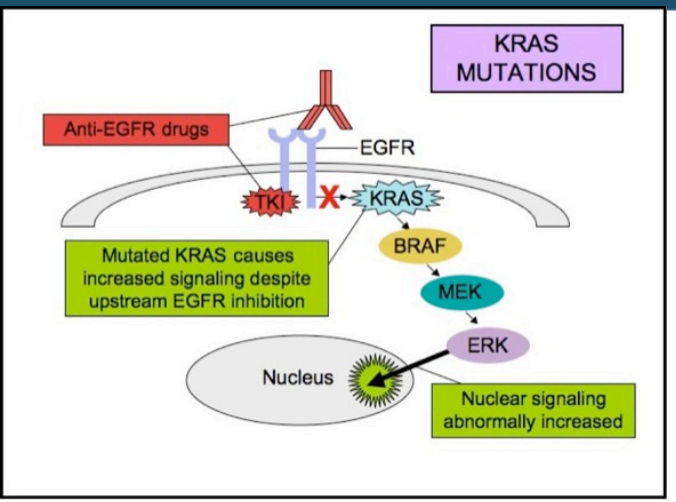
- Biopsies tissulaires : fixation ! → endommage ADN ⇔ conservateurs des échantillons sanguins

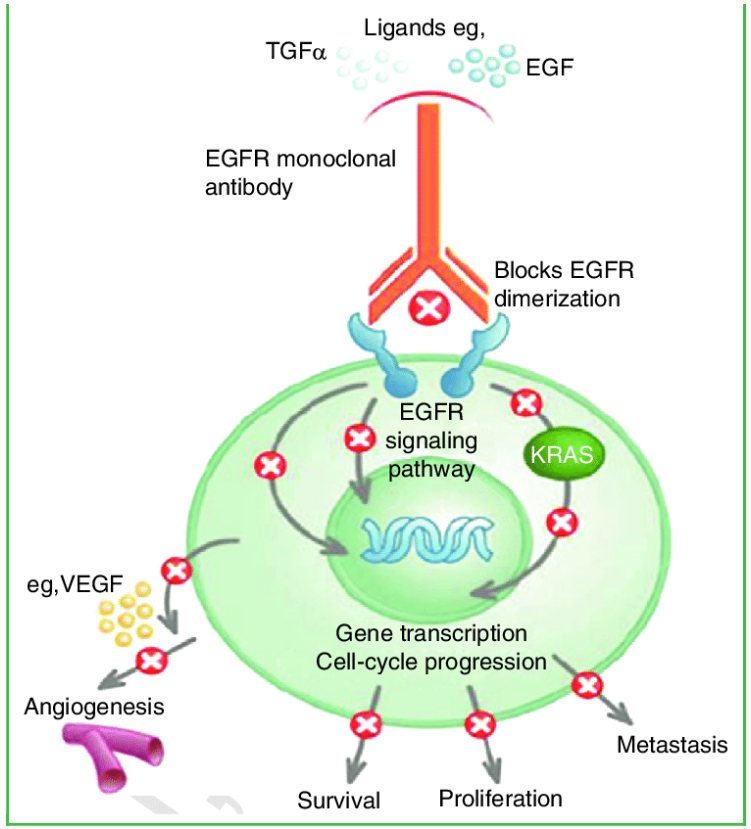
- Tubes EDTA vs Streck : Quantité d'ADNct moindre

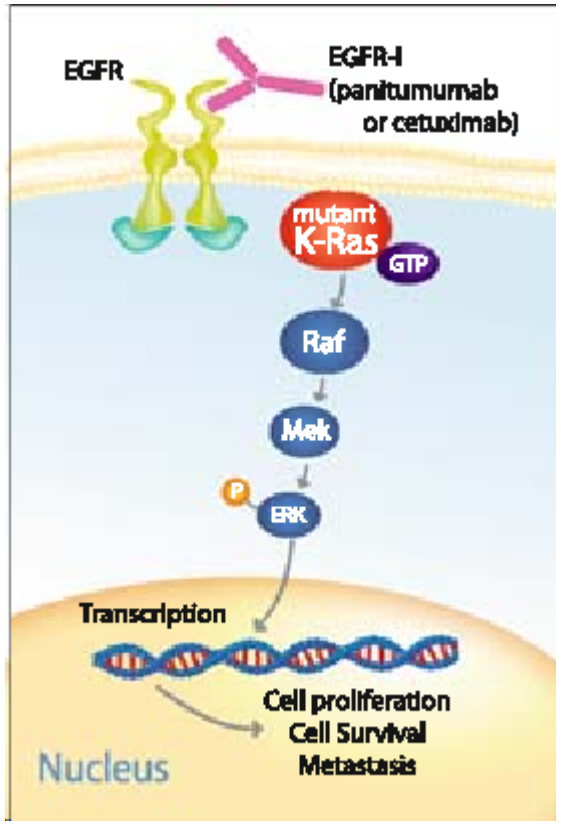
Timeline | **Detection of various forms of cfDNA in patients with different types of cancer**



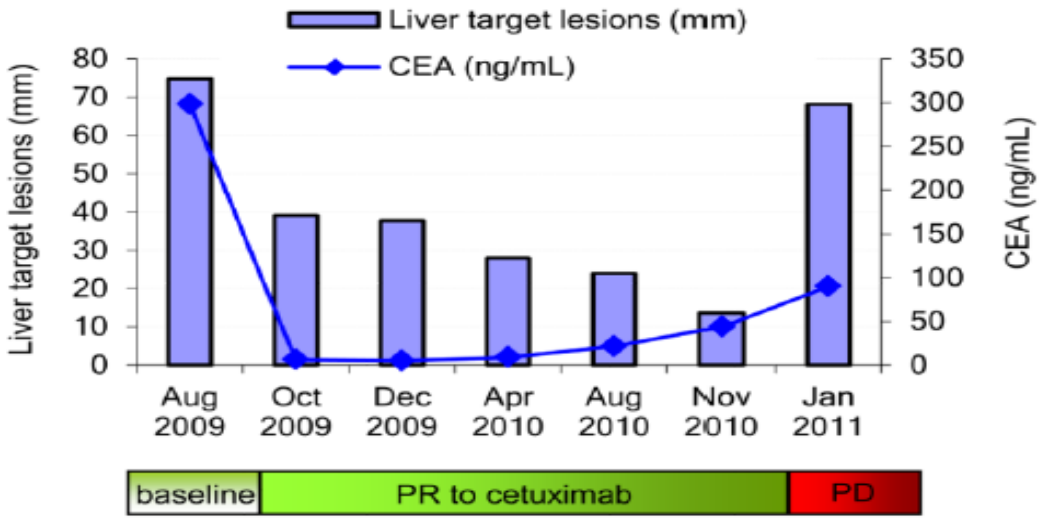
The development of the detection of genetic and epigenetic alterations, as well as the measurement of DNA integrity and viral DNA, in blood from patients with different tumour types over the past decade is shown. We show only significant, prognostic findings from >40 patients with serum, plasma or bodily fluid detection of cell-free DNA (cfDNA) from individual cancers. This timeline is not meant to be comprehensive and is based on our own personal view of what have been important clinical translational events. EBV, Epstein–Barr virus; EGFR, epidermal growth factor receptor; HBV, hepatitis B virus; HPV, human papilloma virus; LOH, loss of heterozygosity.


KRAS MUTATIONS
Anti-EGFR drugs
EGFR
TKI
KRAS
BRAF
MEK
ERK
Mutated KRAS causes increased signaling despite upstream EGFR inhibition
Nucleus
Nuclear signaling abnormally increased

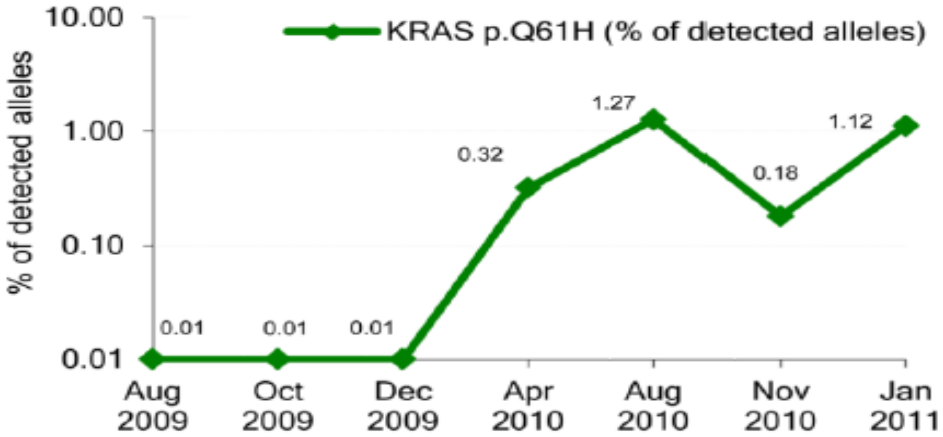

Ligands eg,
TGFα
EGF
EGFR monoclonal antibody
Blocks EGFR dimerization
EGFR signaling pathway
KRAS
eg,VEGF
Gene transcription
Cell-cycle progression
Angiogenesis
Metastasis
Survival
Proliferation


EGFR
EGFR-I (panitumumab or cetuximab)
mutant K-Ras
GTP
Raf
Mek
P
ERK
Transcription
Cell proliferation
Cell Survival
Metastasis
Nucleus

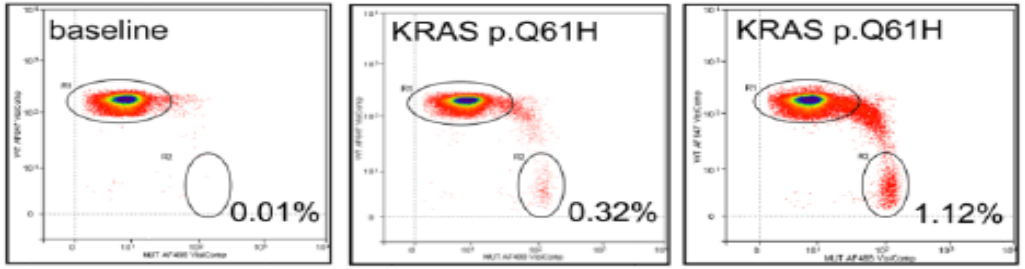
a

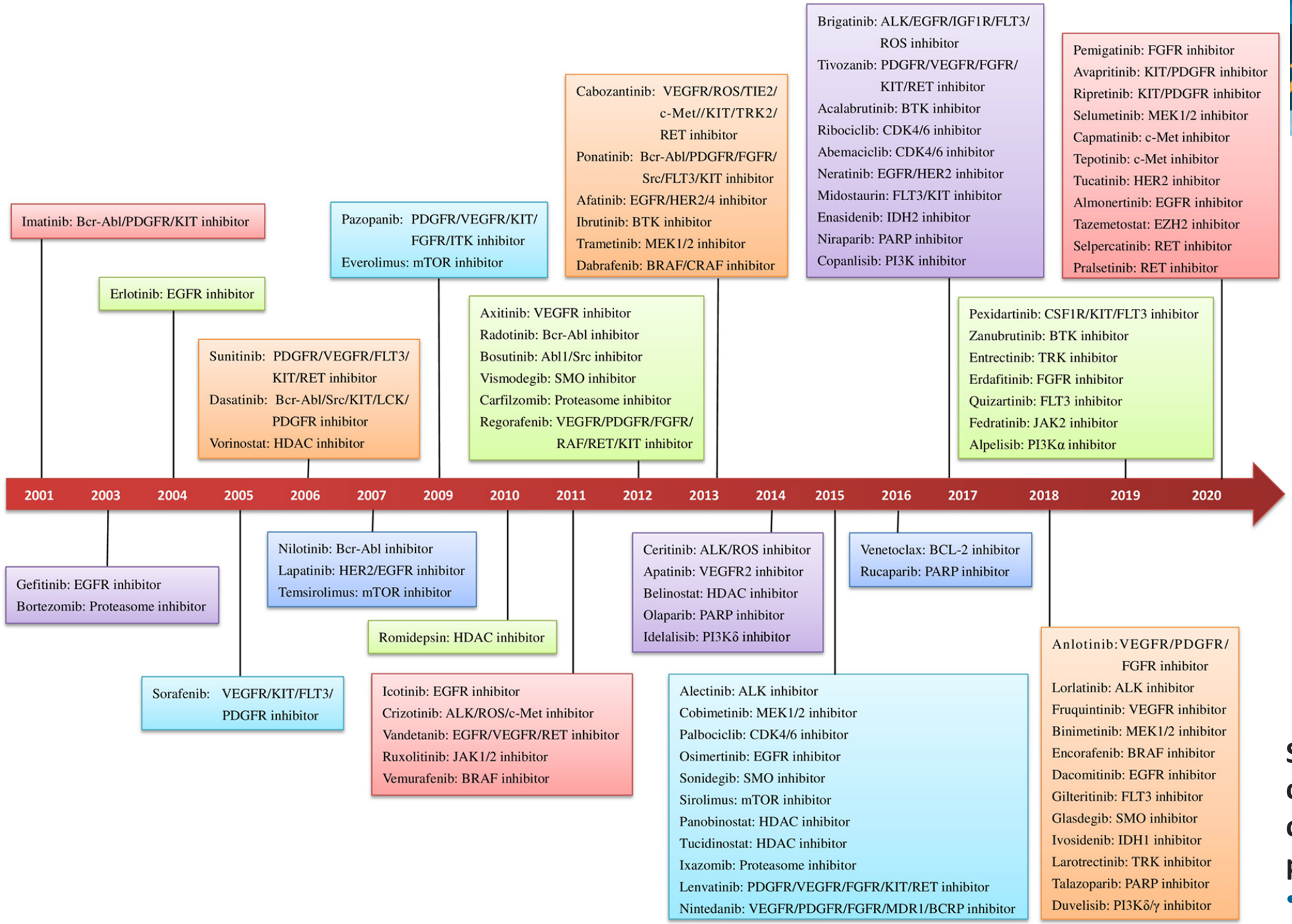

Liver target lesions (mm)
CEA (ng/mL)
Liver target lesions (mm)
CEA (ng/mL)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
350
300
250
200
150
100
50
0
Aug 2009
Oct 2009
Dec 2009
Apr 2010
Aug 2010
Nov 2010
Jan 2011
baseline
PR to cetuximab
PD

b


KRAS p.Q61H (% of detected alleles)
% of detected alleles
10.00
1.00
0.10
0.01
0.01
0.01
0.01
0.32
1.27
0.18
1.12
Aug 2009
Oct 2009
Dec 2009
Apr 2010
Aug 2010
Nov 2010
Jan 2011

c


baseline
0.01%
KRAS p.Q61H
0.32%
KRAS p.Q61H
1.12%

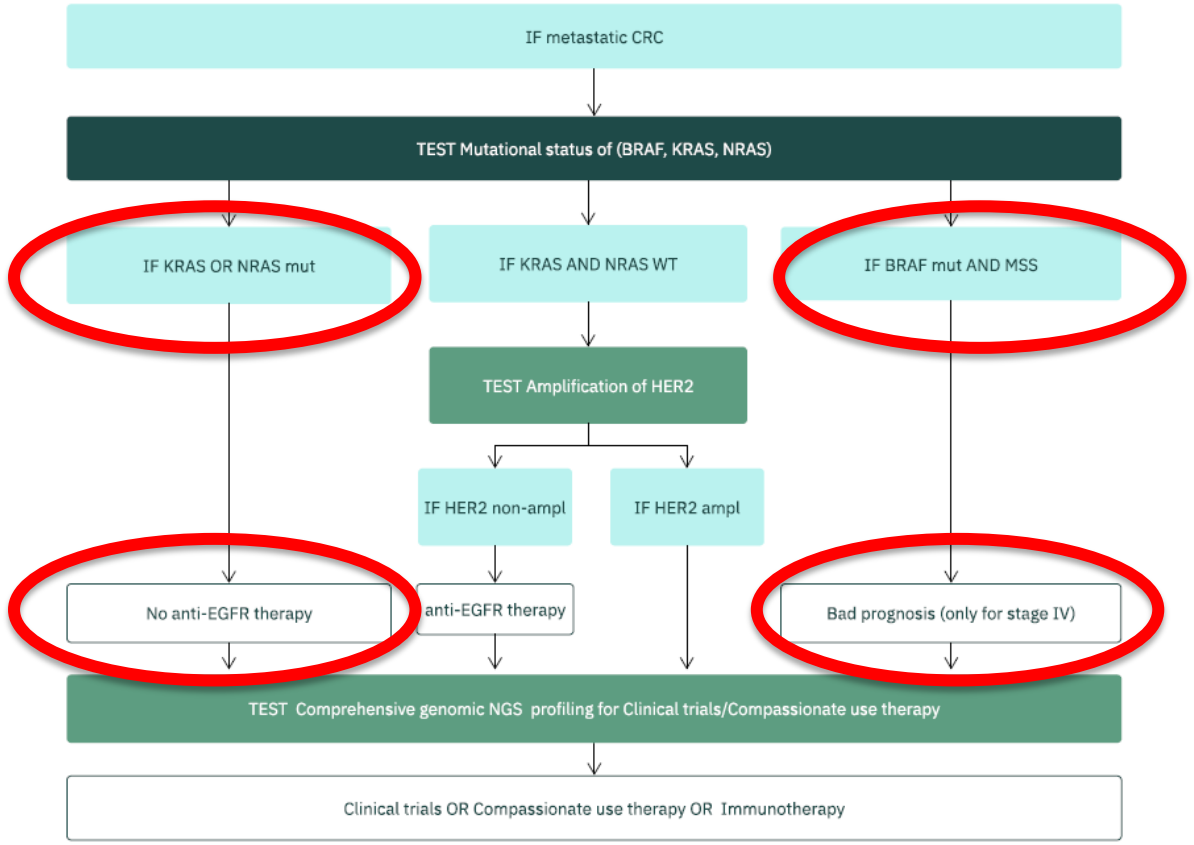


Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives

•Lei Zhong,

Colorectal cancer (CRC)

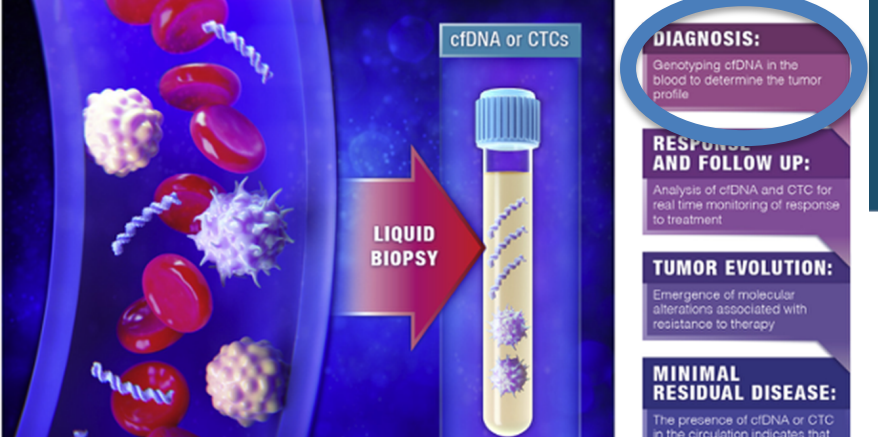
March 2021



These workflows are considered as a tool for good clinical practice. Some of the recommended molecular tests present in the workflows are not yet reimbursed by the INAMI/RIZIV.

Test level 1 & 2A : Molecular tests are recommended

Test level 2B : Molecular tests are not yet recommened



Essai clinique multicentrique incluant 100 patients avec CCR métastasés (avec métastase hépatique exclusivement)

Baseline

- *KRAS* mutant - found in tumor tissue only
- *KRAS* mutant - concordant
- *BRAF* mutant - concordant
- *RAS/BRAF* wild type - concordant
- *KRAS/BRAF* mutant - found in liquid biopsy only

➔ 93% concordance tissue vs liquid biopsy

Figure 2 Concordance between liquid biopsy circulating tumor DNA and tumor tissue DNA *KRAS/BRAF* mutation status before the start of therapy in 100 liver-only metastasized colorectal cancer patients.

Concordance with high sensitivity NGS analysis on plasma

96% KRAS
overall concordance

98% sensitivity

95% specificity

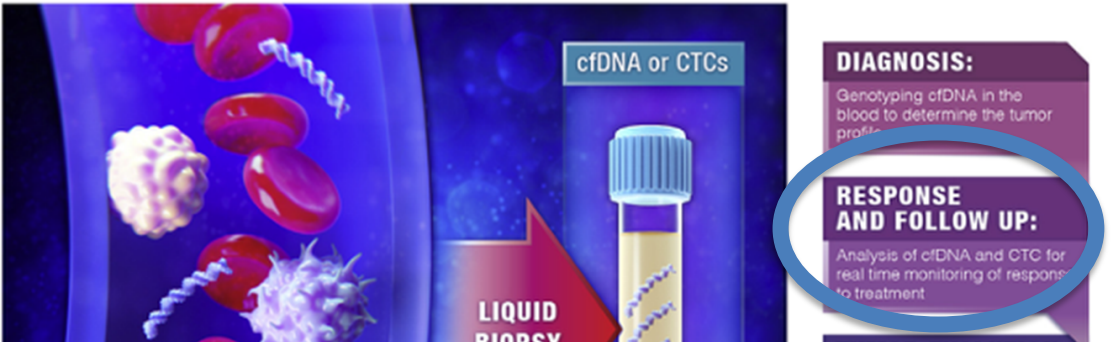
		Plasma NGS analysis	
		Mutant	Wild-type
Plasma Idylla™	Mutant	84	5
	Wild-type	2	90

46% KRAS mutants

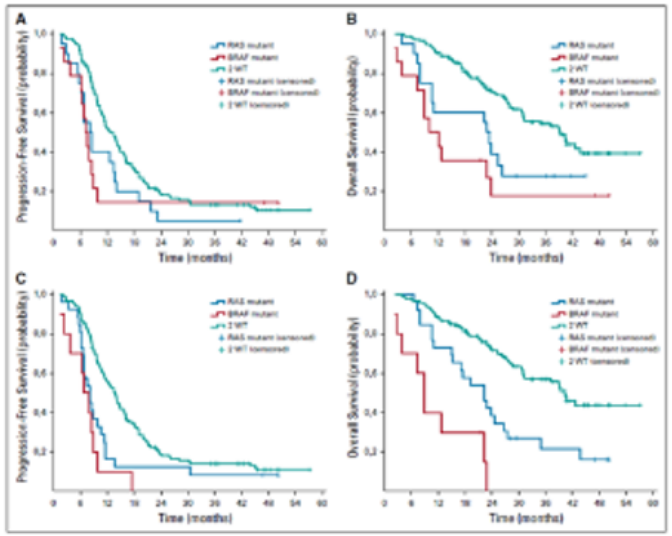
➔ Stratégie de testing **la + optimale** (€) pour éligibilité traitement anti-EGFR

1. **BL**
2. Si BL RAS WT → FFPE

Source: Iris van't Erve et al. J Mol Diagn 2020



- Pour les cancers colorectaux métastasés, traités en première ligne par chimiothérapie et thérapie anti-EGFR



TISSUE	PFS	mOS
RAS mut	8.2	21.6
BRAF mut	7.1	10.1
2 x WT	12.9	39.4
P-value	*P = .02*	*P < .001*

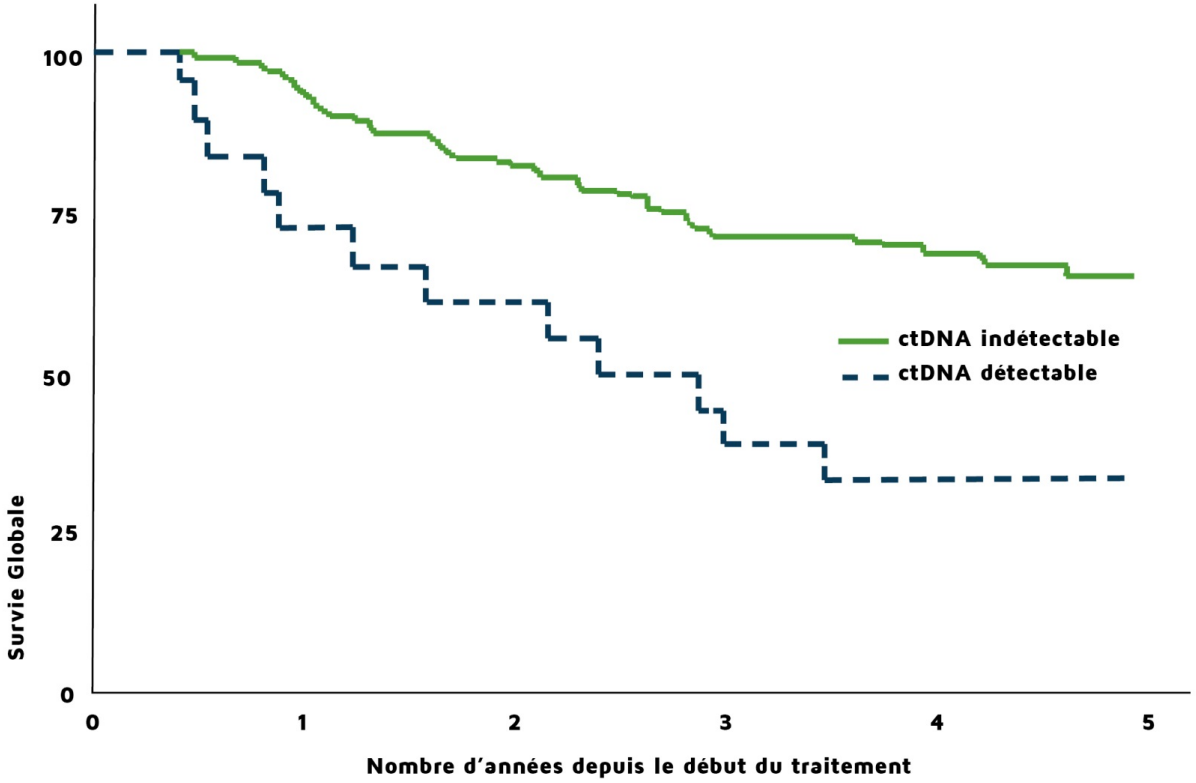
=

PLASMA	PFS	mOS
RAS mut	8.2	22.3
BRAF mut	6.7	8.9
2 x WT	13.6	40.4
P-value	*P < .001*	*P < .001*

Source: Maurel et al. JCO Precis Oncol 2019

- PFS et OS basés sur l'analyse sur ADN circulant est similaire, si pas meilleure que si testé sur tissu FFPE.

1er article sur applications cliniques biopsie liquide cancers colorectaux
2017,Thierry et al



Thierry et al. Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. Ann Oncol 2017;28,9:2149-59

L'actualité

- Dernières données provenant de l'ASCO 2021 (American Society of Clinical Oncology) sur les biopsies liquides dans les :
  - Cancers colorectaux
  - Cancers du sein
  - Cancers du poumon

Les Biologistes Médicaux BIO MED 2021 LES JOURNÉES POUR L'AVENIR DE LA BIOLOGIE MÉDICALE

Phase II WJOG8916G : Résultats selon ADNtc

Design de l'étude

- CCRm RAS wt
- ≥ 20 ans
- CCRM non résécable
- ECOG 0-1
- Progression sous 5FU; irinotécan,
- Oxaliplatine ; anti-VEGF; et anti-EGFR

n=53 patients

Protocole

Trifluridine/tipiracil (FTD/TPI)
+ Cetuximab rechallenge

- FTD/TPI - 35 mg/m² 2 x par jour, j1-5, 8-12 q4sem
- Cetuximab – dose initiale de 400 mg/m² suivi par 250 mg/m² par semaine

Dans la partie sécurité des **6 patients initiaux**, si le DLT était observé chez ≥ 3/6 patients, la dose de FTD/TPI serait reconsidérée.

Objectif Principal :

→ Taux de Contrôle

▶ Objectif DCR > 65%

Objectifs secondaires :

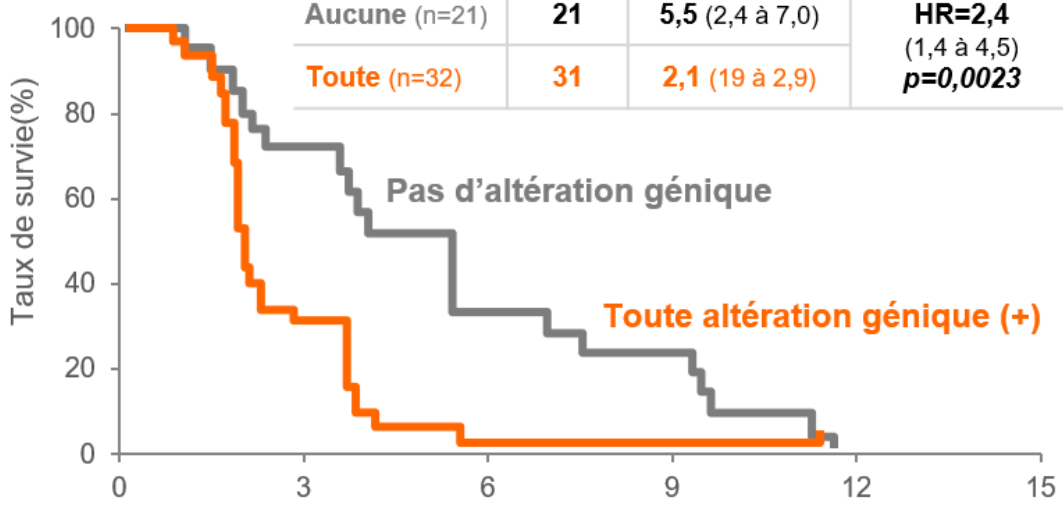
→ Taux de réponse, PFS, SG, toxicité

→ **ADNtc** (RAS, BRAF, PI3CA, ERBB2, MET)

Phase II WJOG8916G : Résultats selon ADNtc

Survie sans progression

Altération des gènes	Nb d'évènements	SSP médiane (M) (IC 95%)	HR (IC 95%) *p*
Aucune (n=21)	21	5,5 (2,4 à 7,0)	HR=2,4 (1,4 à 4,5) *p=0,0023*
Toute (n=32)	31	2,1 (19 à 2,9)	

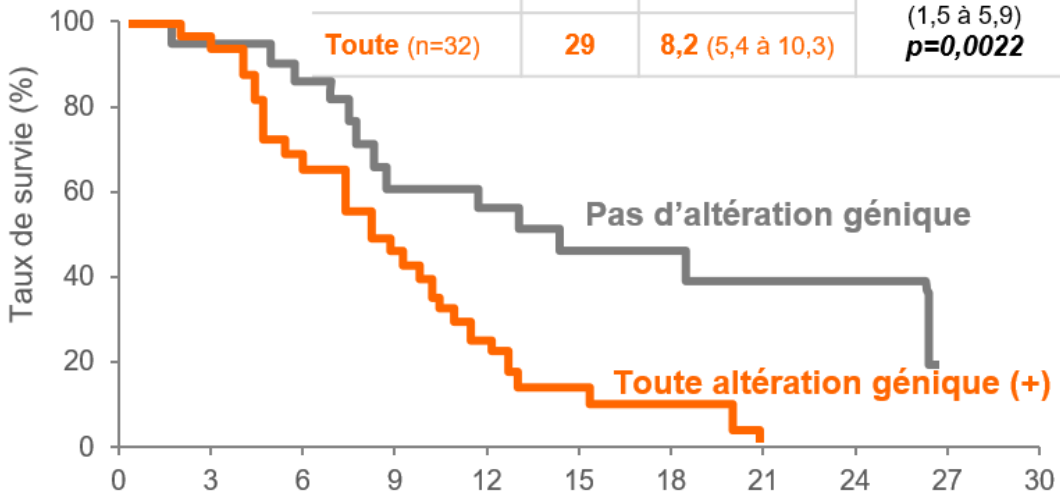


Nb. à risque - altération

Aucune	21	16	8	6	0
Toute	32	11	2	2	0

Survie Globale

Altération des gènes	Nb d'évènements	SG médiane (M) (IC 95%)	HR (IC 95%) *p*
Aucune (n=21)	13	14,2 (7,7 à)	HR=2,8 (1,5 à 5,9) *p=0,0022*
Toute (n=32)	29	8,2 (5,4 à 10,3)	



Nb. à risque - altération

Aucune	21	21	19	14	12	8	7	6	5	1
Toutes	32	31	22	15	8	4	3	0		

- Impact pronostique confirmé selon ADNtc - *vs* ADNtc + tous gènes (PFS 5,5 *vs* 2,1 m et SG 14,2 *vs* 8,2m)
- Résultats similaires ADNtc - *vs* ADNtc+ selon RAS ou BRAF ou PI3KCA (pas pour ERBB2, MET)
- Impact prédictif indéterminé devant l'absence de groupe contrôle

ADNtc et CCRm

VAF : fraction de l'allèle mutant dans l'échantillon

Analyse étude VALENTINO

Patients *RAS* wt non traités et atteints d'un CCRm non résécables

Facteurs de stratification
- Centre
- Adjuvant antérieur (O/N)
- N. sites métastatiques (1/>1)

R 1:1
N=229

FOLFOX-4 jusqu'à 8 cycles — **Bras A** 5-FU/LV

FOLFOX-4 jusqu'à 8 cycles — **Bras B**

Traitement d'induction — *Traitement d'entretien*

Progression de la maladie / toxicité inacceptable / retrait du consentement

FOLFOX-4
oxaliplatin 85 mg/m², d1 q14
LV 200 mg/m², d1, 2 q14
5FU bolus 400 mg/m² d1, 2 q14
5FU pvi 600 mg/m², d1, 2 q14

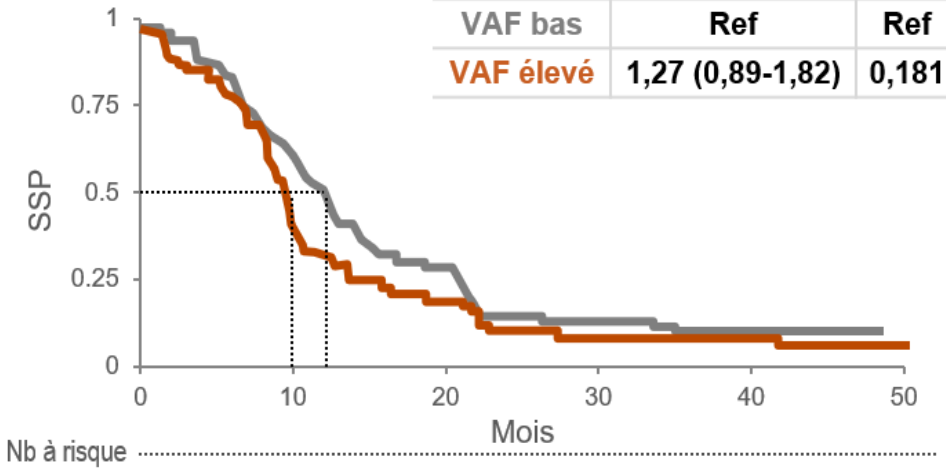
5-FU/LV
LV 200 mg/m², d1, 2 q14
5FU bolus 400 mg/m² d1, 2 q14
5FU pvi 600 mg/m², d1, 2 q14

Panitumumab
panitumumab 6 mg/kg d1 q14

Pietrantonio F et al, JAMA Oncol 2019

mSSP : 9,9 vs 12,7 mois

	HR (95% CI)	*p*
VAF bas	Ref	Ref
VAF élevé	1,27 (0,89-1,82)	0,181

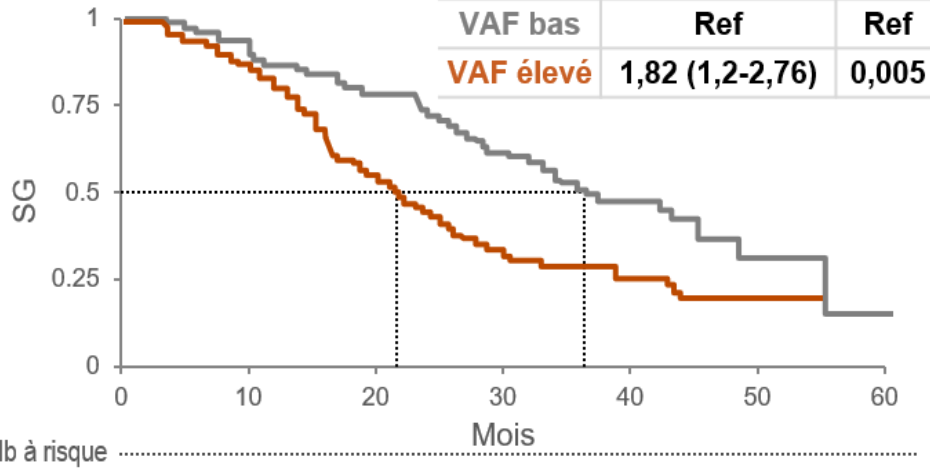


Nb à risque

68	44	20	9	4	0
67	33	13	6	5	1

mSG : 21,8 vs 36,5 mois

	HR (95% CI)	*p*
VAF bas	Ref	Ref
VAF élevé	1,82 (1,2-2,76)	0,005



Nb à risque

68	62	53	42	26	6	1
67	58	37	23	15	4	0

- **ADNtc:**
Impact **pronostique** confirmé uniquement sur la SG.
- Ne permet pas d'être intégré à la stratégie à ce stade.

Cancers colorectaux métastasés & BRAF V600E muté - Place du Cell Free DNA (ctDNA)

- Contexte

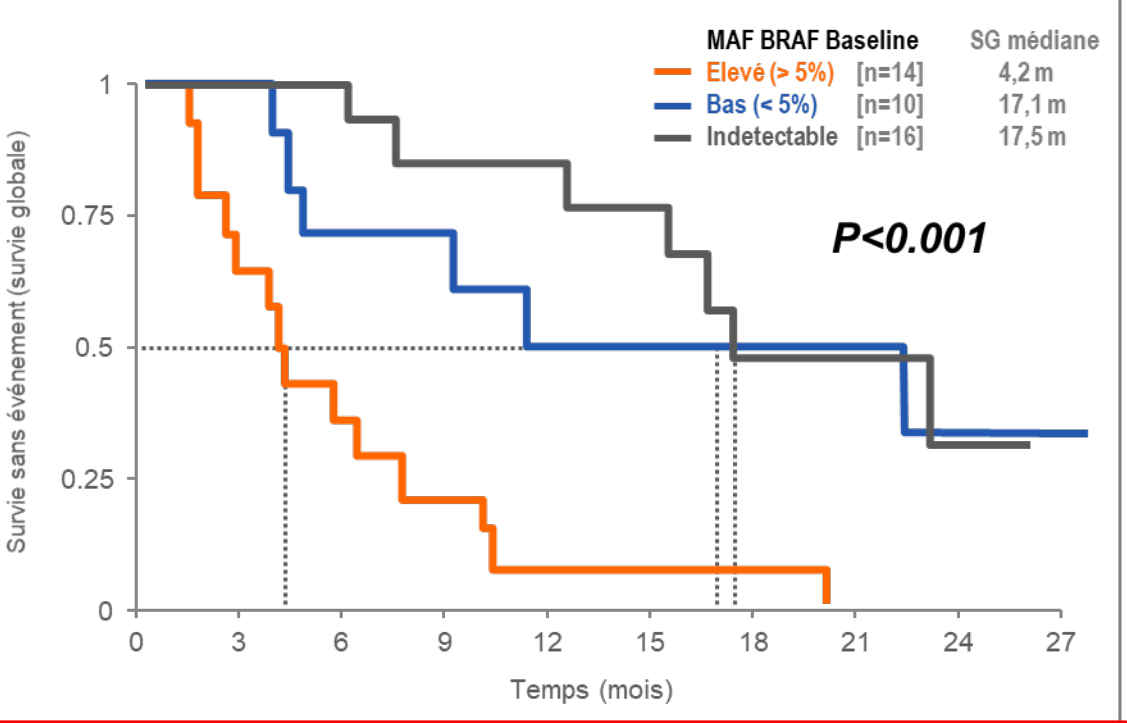
  - La fraction de l'allèle mutant dans l'échantillon (MAF) = % allèles mutés parmi totalité des allèles
  - Seuil de 5% ctDNA RAS muté identifié comme facteur pronostic
  - Quid du ctDNA **BRAF** chez les BRAF muté V6600E

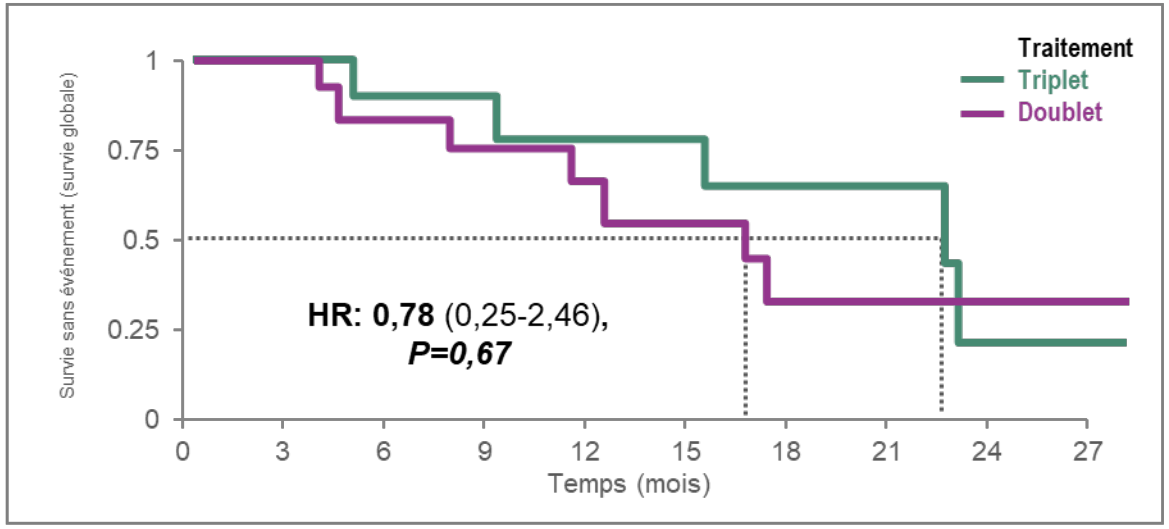
Impact of circulating tumor DNA mutant allele fraction on prognosis in RAS-mutant metastatic colorectal cancer

Elena Elez [1]

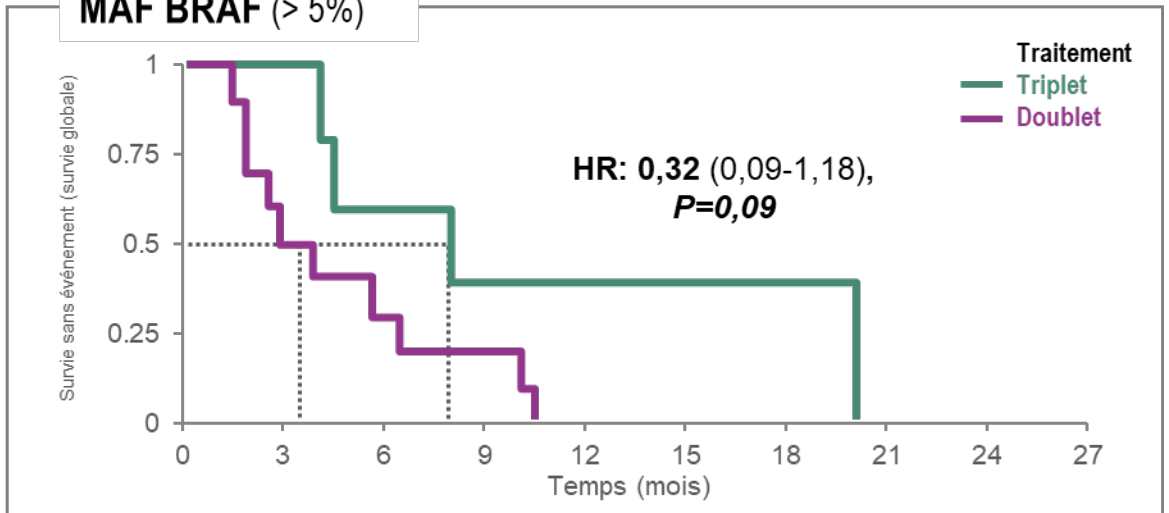
- WCGI 2021
  - → 282 patients présentant un CCRm muté BRAF V600E (40 exploitables)
  - → Patients avec une mutation BRAF MAF (CtDNA) > 5 % : 14 ; < 5%: 10 ; Indétectable : 16

Analyse univariée MAF BRAF baseline (n=40)



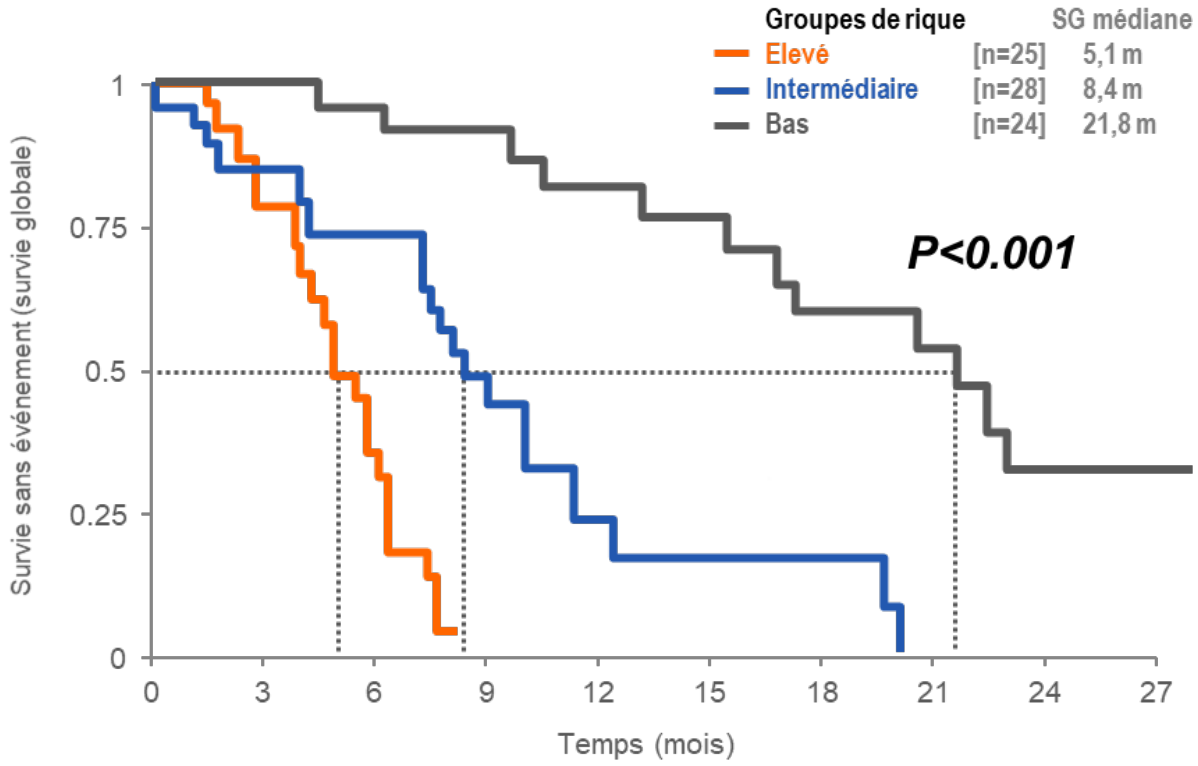


MAF BRAF (> 5%)

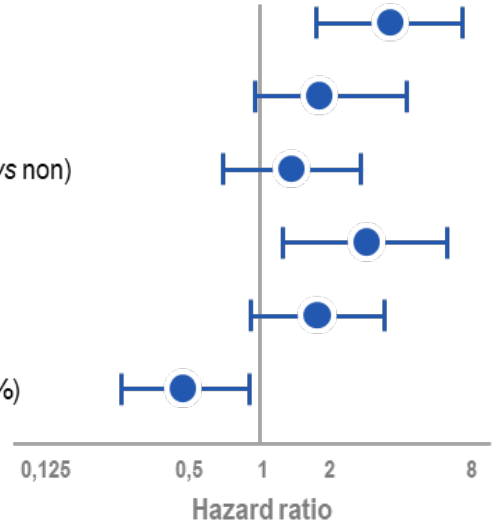


Un pourcentage d'allèle muté BRAF > 5% en ADNtc est un facteur de mauvais pronostic en analyse univariée

Groupe de risque basé sur les résultats du modèle multivarié



Modèle multivarié de survie globale



	HR (IC 95%)	*p*
ECOG (1+ *vs* 0)	**3,44** (1,71-6,93)	**<0,001**
Sites tumoraux (3-4 *vs* 1-2)	**1,73** (0,93-4,22)	**0,08**
Métastases hépatiques (oui *vs* non)	**1,35** (0,7-2,61)	**0,37**
Niveau de dNLR (>5 *vs* <5)	**2,74** (1,23-6,09)	**0,01**
Niveau de CEA (>10 *vs* <10)	**1,73** (0,92-3,28)	**0,09**
MAF BRAF (WT or <5% *vs* >5%)	**0,48** (0,26-0,91)	**0,02**

6 variables : création d'un score pronostique avec risque élevé, intermédiaire et bas.

Le score utilisant le pourcentage d'allèle muté BRAF en ADNtc identifie les patients avec un mauvais pronostic

Étude CHRONOS : Contexte

- **Rechallenge :** Réutilisation, après un intervalle de temps donné, d'un agent thérapeutique auquel la tumeur était initialement sensible puis a développé une résistance

- 3 études prospectives validant le concept avec un traitement à base d'anti-EGFR :
  → RO entre **3** et **54%,** SSP médiane entre **2,4 et 6,6 mois**.
  (Santini et al, Ann Oncol 2012; Osawa et al, ESMO 2018; Tsuji et al, Br J Cancer 2020)

- **Etude Cricket (n=28)** *(Cremolini et al, JAMA Oncol 2019)* : 1ère étude clinique prospective évaluant en L3 du CCRm chez des patients prétraités de manière homogène et couplée avec la constitution d'une collection prospective de biopsies liquides :
  → RO : **21%**; SSP : **3,4 mois**; SG : **9,8 mois** dans la population globale.
  → Bénéfice augmenté en cas de statut RAS WT de l'ADNtc au rechallenge.

- **ASCO 2021 :** Étude CHRONOS : 1ère étude interventionnelle utilisant les résultats de la biopsie liquide pour guider le rechallenge des anti-EGFR

Étude CHRONOS

- Phase II multicentrique, italienne
- Hypothèse : avoir 6 réponses sur 27 patients inclus (soit H1≥30% et H0=10%); puissance = **85%**, risque **α=0,05**

Design de l'étude

CCRm RAS/BRAF WT sur tissu

- préalablement traité par anti-EGFR avec réponse puis progression
- progressant sous un traitement d'intervalle sans anti-EGFR
- Statut RAS, BRAF et EGFR non muté en biopsie liquide avant l'inclusion
- OMS 0-2

Panitumumab jusqu'à progression

Critère jugement principal :

- Taux de réponse (relecture centralisée)

Critères jugement secondaires :

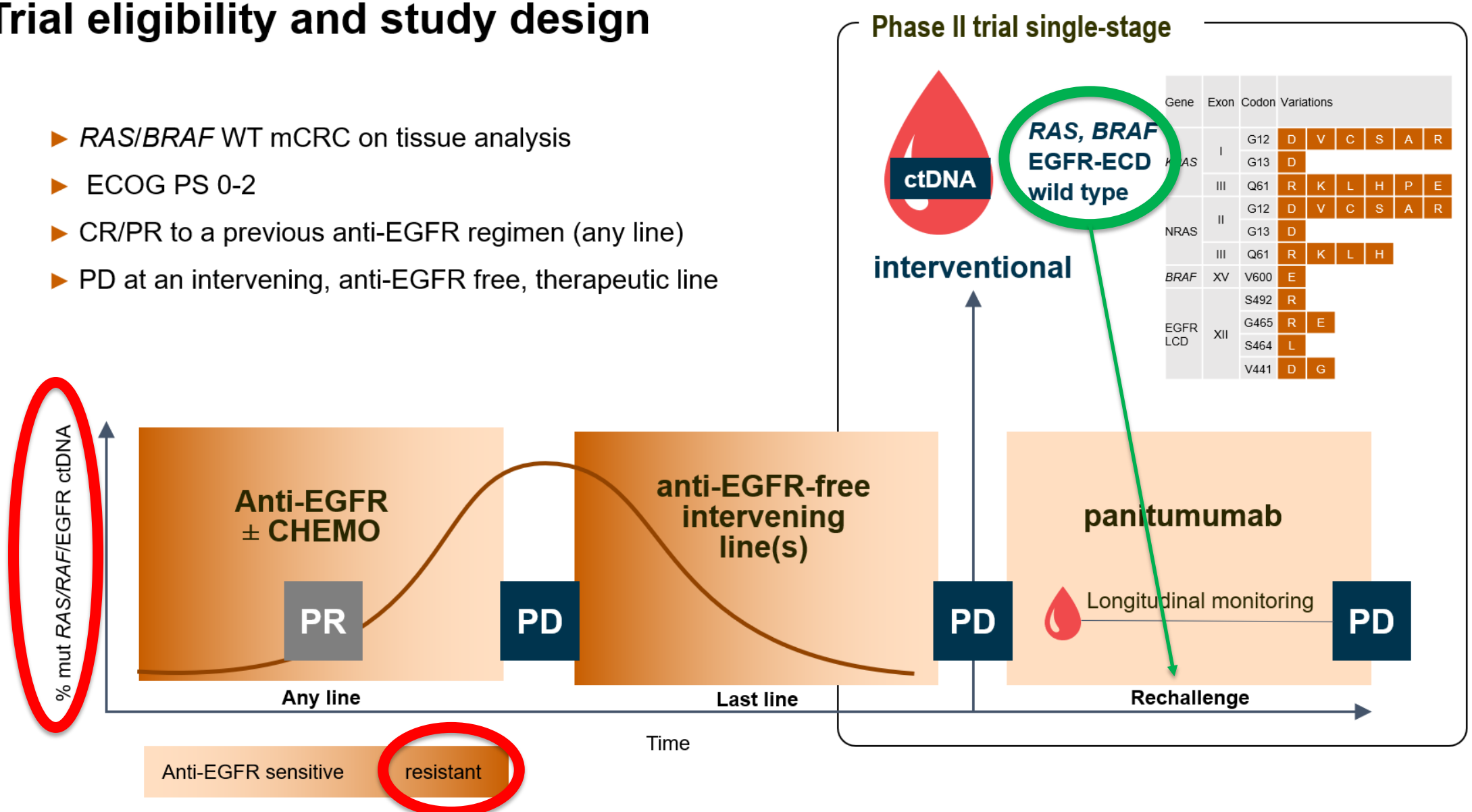
- SSP,SG, toxicités

Etudes translationnelles :

- Analyse ADNcir à baseline, à progression, cinétique/ analyse tissulaire extensive

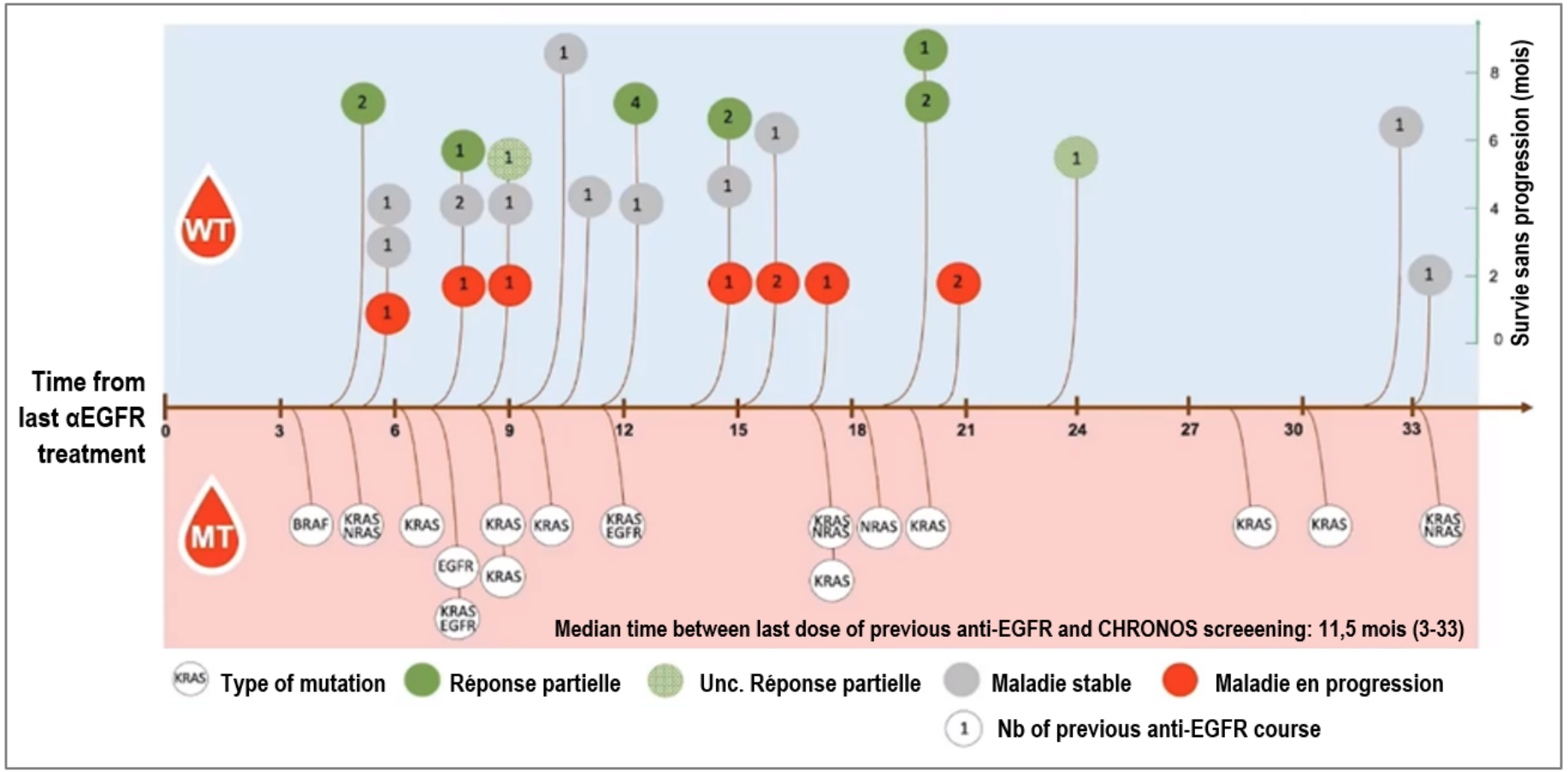
Trial eligibility and study design

- *RAS*/*BRAF* WT mCRC on tissue analysis
- ECOG PS 0-2
- CR/PR to a previous anti-EGFR regimen (any line)
- PD at an intervening, anti-EGFR free, therapeutic line



Gene	Exon	Codon	Variations					
KRAS	I	G12	D	V	C	S	A	R
		G13	D					
	III	Q61	R	K	L	H	P	E
NRAS	II	G12	D	V	C	S	A	R
		G13	D					
	III	Q61	R	K	L	H		
BRAF	XV	V600	E					
EGFR LCD	XII	S492	R					
		G465	R	E				
		S464	L					
		V441	D	G				

Étude CHRONOS : Résultats



- Présence de mutations RAS/BRAF/EGFR en ADNcir à baseline indépendante du temps écoulé depuis le dernier traitement à base d'anti-EGFR
- Réponse au rechallenge indépendante du temps écoulé depuis le dernier traitement à base d'anti-EGFR, du nombre de lignes préalables, du site de la tumeur primitive

Étude CHRONOS : Nouvelle étude qui démontre:

- Une activité intéressante du rechallenge par anti-EGFR
  → Patients RAS/BRAF/EGFR non mutés, lourdement prétraités avec au moins une ligne comprenant un anti-EGFR.

- L'intérêt clinique d'associer au rechallenge un génotypage par ADNtc
  → Pour sélectionner les patients (qui semble supérieur aux seuls critères cliniques jusque-là utilisés pour cette stratégie: durée de réponse au traitement à base d'anti-EGFR préalable, temps écoulé par rapport au dernier traitement à base d'anti-EGFR…).

- Des limites :
  → Faible effectif, pas de comparaison avec les traitements standards validés dans cette situation (regorafenib, trifluridine/tipiracil), problème de l'accès à l'analyse de l'ADN tumoral circulant/standardisation des méthodes d'analyse.

- Première étude **interventionnelle** avec les biopsies liquides comme guide de la thérapie anti-EGFR dans les cancers colorectaux métastasés.
- Une réponse de 30% a été obtenue après un rechallenge basé sur le ctDNA avec du panitumumab (anti-EGFR), rencontrant le but primaire de l'étude.
- Un **rechallenge basé sur le ctDNA a 3 avantages par rapport au rechallenge basé sur la clinique:**

1. Sélectionne les patients selon le statut moléculaire réel de la tumeur, indépendant des intervalles de temps, des traitements précédents ou de la localisation tumorale
2. **Évite les traitements potentiellement inutiles** dans approximativement **30%** des patients porteurs d'une mutation de résistance & éligibles à un rechallenge sur base clinique
3. **Améliore le taux de réponse**

- ➔ Le **rechallenge basé sur le ctDNA est une option thérapeutique validée** permettant une diminution de la tumeur même dans les cas de CCR métastatiques avant traitement.

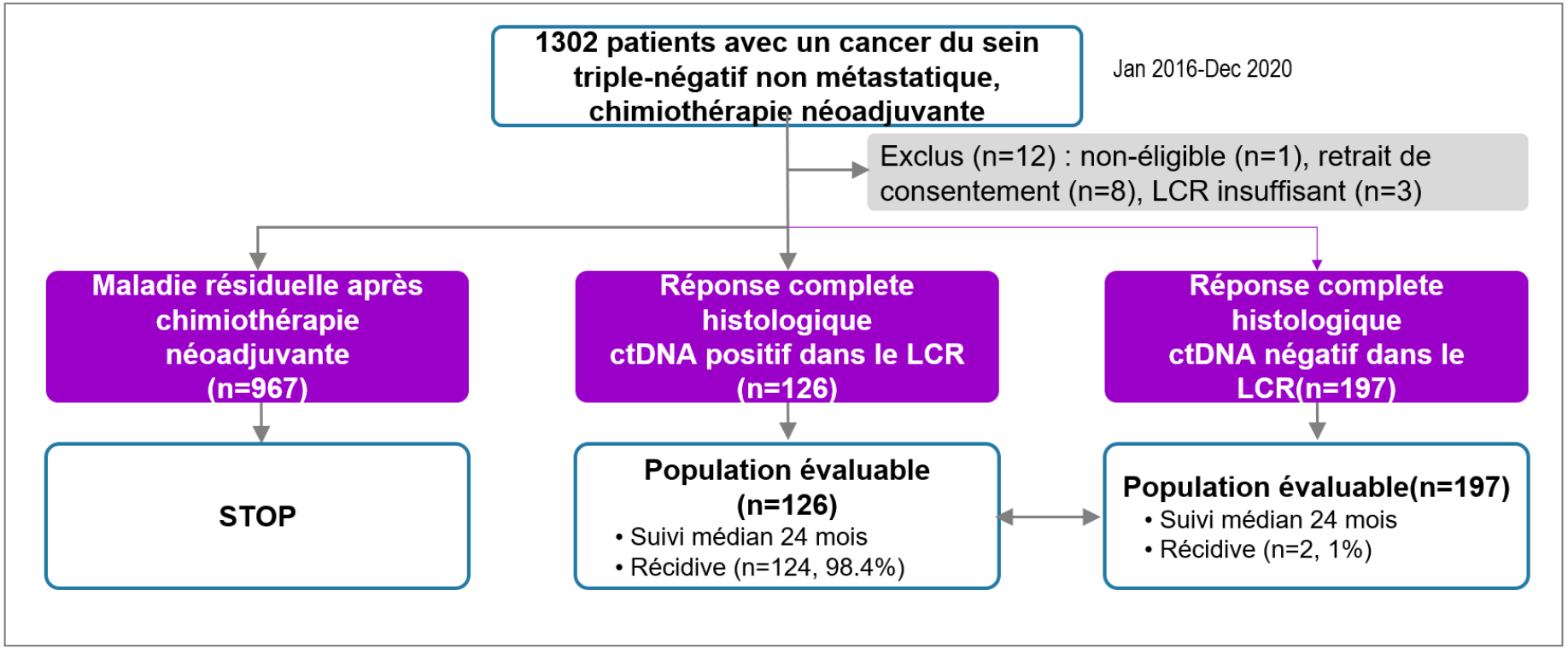
- **LE GENOTYPAGE DE L'ADN TUMORAL DANS LE SANG POUR DIRIGER LA THERAPIE PEUT ETRE INCORPORE DANS LE MANAGEMENT DES CAS AVANCES DE CCRm.**

CANCERS DU SEIN

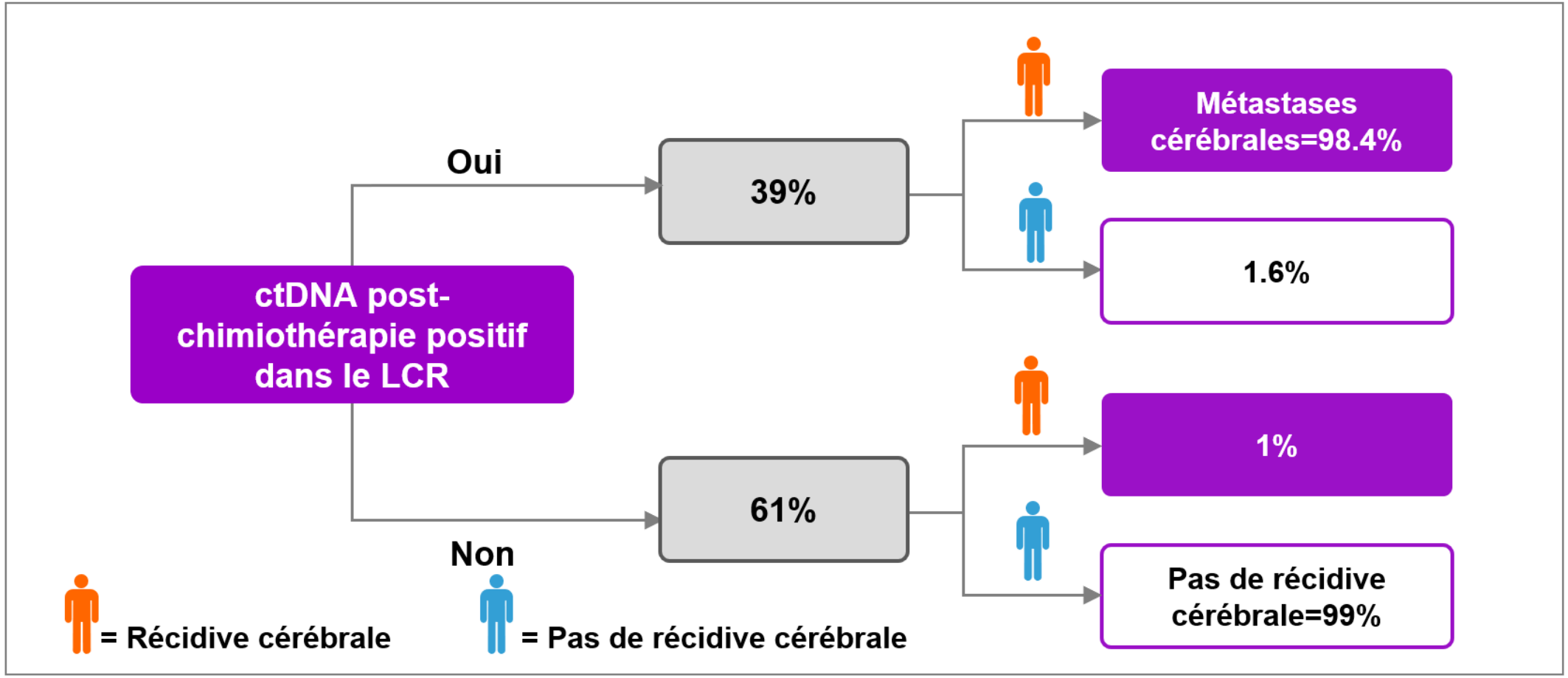
ADNcirculant dans le LCR: détection précoce du risque d'évolution cérébrale dans les cancers du sein triple négatif

L. Raimondi, et al., ASCO2021, Abs #507

Est ce que le ADN circulant céphalorachidien peut détecter la maladie résiduelle?



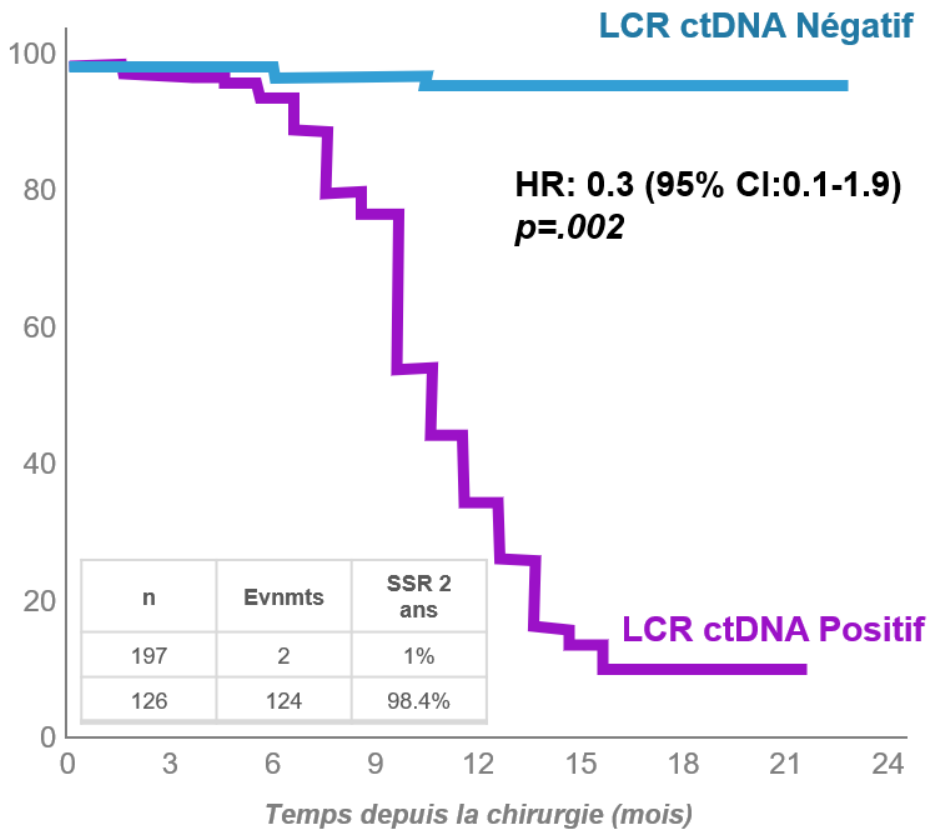
ADN circulant céphalorachidien et performance prédictive



NACT: neo-adjuvant chemotherapy; CR: complete response; CSF: cerebrospinal fluid; ctDNA: circulating tumour DNA; BrM: brain metastasis

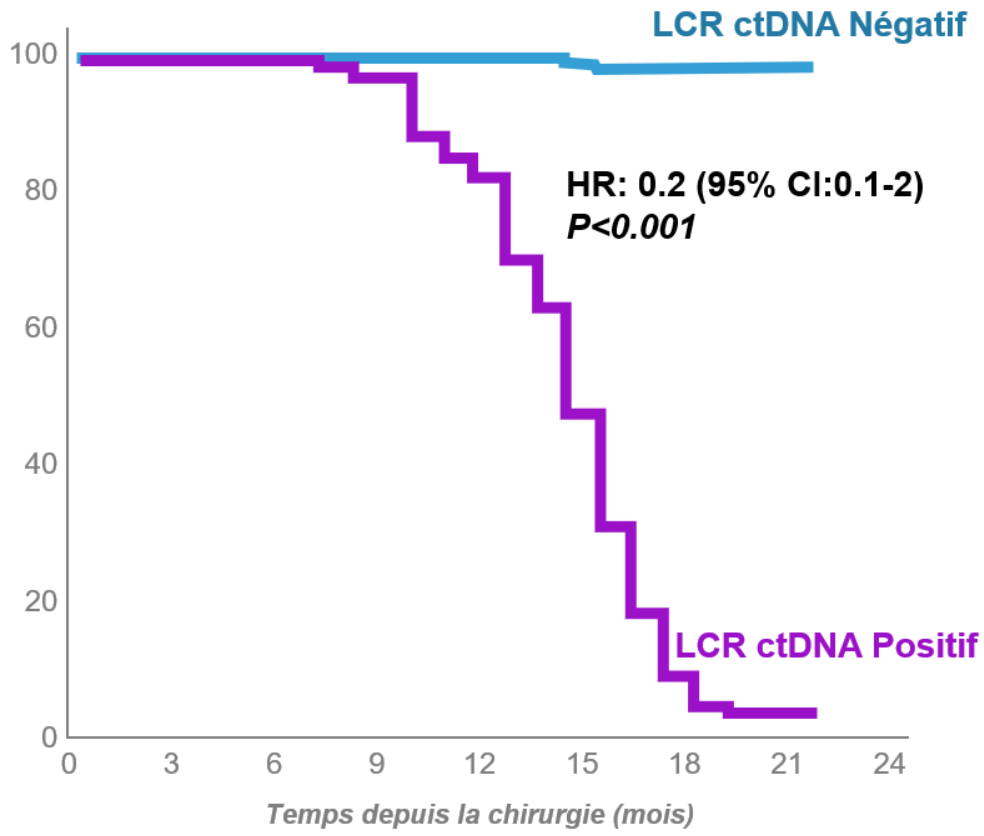
Suivi

Survie sans récidive



n	Evnmts	SSR 2 ans
197	2	1%
126	124	98.4%

Survie globale

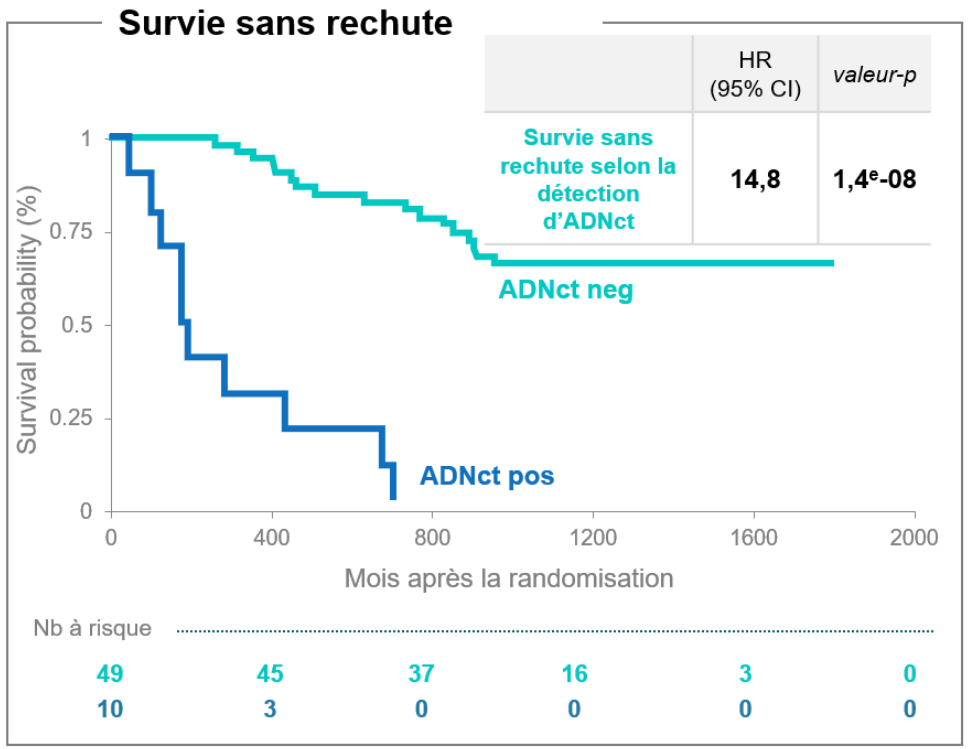


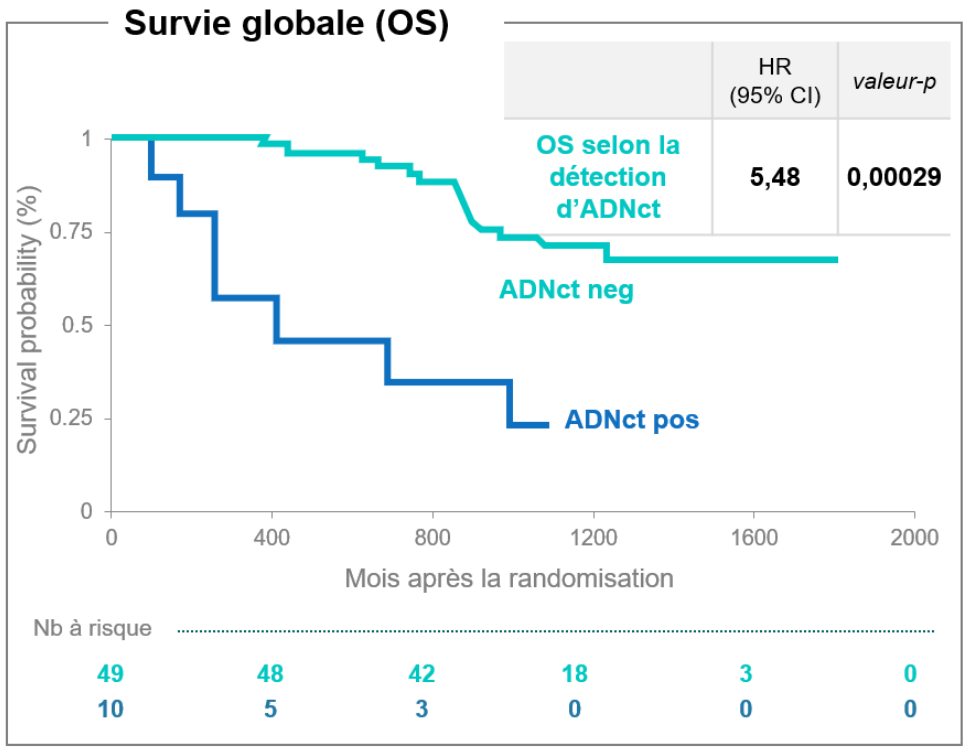
CANCERS DU POUMON

La détection d'ADN tumoral circulant (ADNct) résiduel post traitement local prédit la rechute chez les patients CBNPC de stade précoce

Davina Gale, et al., ASCO® 2021, Abs #8517

La détéction d'ADNct post traitement local est corrélée à la survie sans rechute





- A l'avenir: Utilisation de l'ADNct pour identifier les patients à risque élevé de rechute afin d'adapter la stratégie thérapeutique adjuvante et la surveillance?
- Implémentation technique complexe: Plateforme (exome tissulaire, biopsies liquides), support bioinformatique dédié…

RETOUR A LA CITADELLE

BELAC

Labo CITA

CHR Liège

LABORATOIRE D'ANALYSES MEDICALES

BIO MED 2021

LES JOURNÉES POUR L'AVENIR DE LA BIOLOGIE MÉDICALE

- Accréditation de deux panels NGS (30 gènes et 4 gènes tumoraux) sur biopsie tissulaire (FFPE) (2020)
- **Premier laboratoire belge** à avoir obtenu **l'accréditation NGS sur biopsie liquide** pour panel tumoral (2020)
- Accréditation pour qPCR Idylla Biocartis
  - Sur biopsie tissulaire
    - *KRAS (2018)*
    - *BRAF (2018)*
    - *NRAS (2018)*
    - *EGFR (2018)*
    - MSI (2020)
  - Sur biopsie liquide
    - *KRAS (2018)*
    - *BRAF (2018)*
    - *NRAS (2018)*

- Nouveaux défis
  - Gènes de fusion
  - Nouveaux panels tumoraux avec nouveau séquençeur

Sensibilité diagnostique

Gènes	Technique	Fréquence allélique minimale (% VAF) Biopsie LIQUIDE	Fréquence allélique minimale (% VAF) Biopsie SOLIDE
KRAS	qPCR Idylla	5%	5 à 10%
BRAF	qPCR Idylla	1%	5%
NRAS	qPCR Idylla	5%	10 à 15%
KRAS	NGS Qiagen AIT UMI Panel	5%	5% (3% paramètres informatiques adaptés)
NRAS	NGS Qiagen AIT UMI Panel	5%	5% (3% paramètres informatiques adaptés)
BRAF	NGS Qiagen AIT UMI Panel	5%	5% (3% paramètres informatiques adaptés)
EGFR	NGS Qiagen AIT UMI Panel	2%	5% pour exons 19, 20, 21. 10% exon 18

Interactions clinico-biologiques

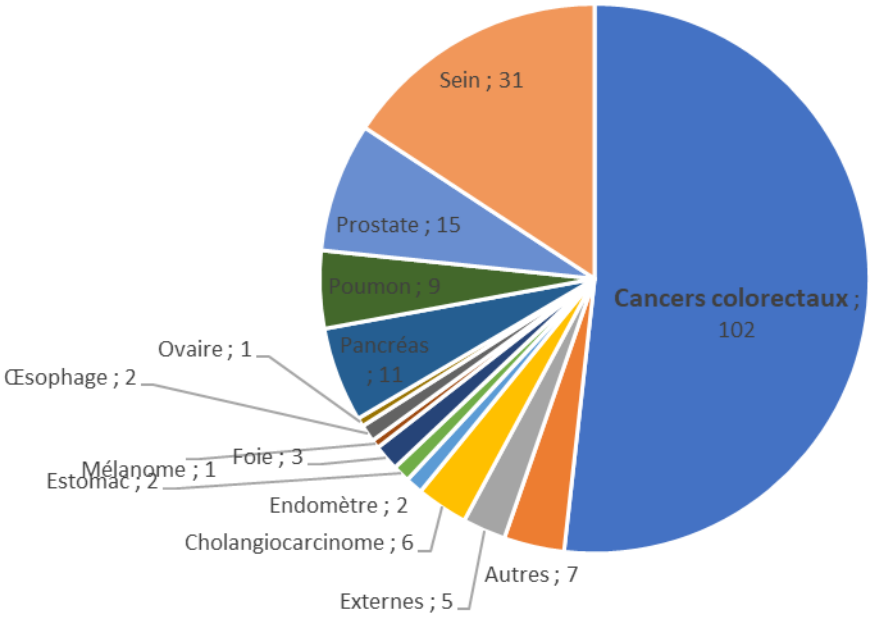
- Participation aux Consultations Oncologique Multidisciplinaire de :

  Pneumologie
  Gastro-entérologie
  Sénologie
  Dermatologie
  Urologie

Etude rétrospective CHR Citadelle

- Analyse rétrospective de 197 biopsies liquides
-
  - **Origine organe cancers initiaux**

Organes	n	%
Cancers colorectaux	102	51.78
Autres	7	3.55
Externes	5	2.54
Cholangiocarcinome	6	3.05
Endomètre	2	1.02
Estomac	2	1.02
Foie	3	1.52
Mélanome	1	0.51
Œsophage	2	1.02
Ovaire	1	0.51
Pancréas	11	5.58
Poumon	9	4.57
Prostate	15	7.61
Sein	31	15.74



Cancers sein et poumon

- Sein : (n= 31)
  - 17 recherches de mutation *PIK3CA* dans biopsie liquide
    - 5 patientes/17 mutées *PIK3CA* → *éligibles pour anti-mTOR*
      - 3 concordances avec FFPE, 2 biopsies solides non disponibles
  - 2 patientes mutées (1 *BRCA1,* 1 *BRCA2*) → *éligibles aux inhibiteurs de PARPP*

- Poumons : (n= 9)
  - 1 patients muté
    - 1 c.2214_2215insAAAATTCCCGTCGCTATC,p.Lys745_Glu746insIleProValAlaIleLys → sensibilité TKI 1ère 2ème 3ème génération.
  - 2 biopsies liquides EGFR Wild type avec tumeur solide EGFR mutée → argument thérapeutique.

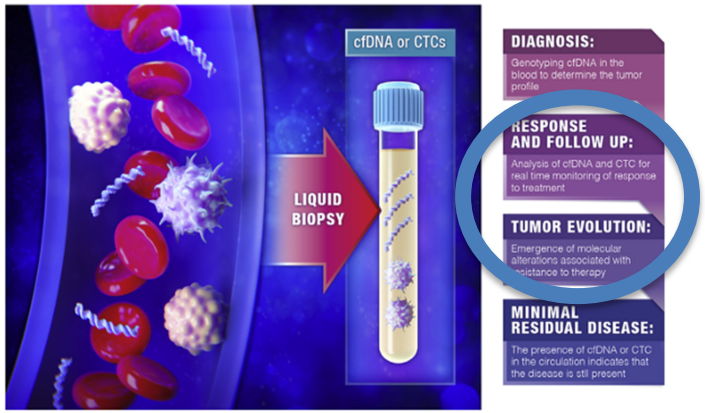
NB : Considérations analytiques cancers du poumon

- Biopsies liquides possibles par PCR digitale
- Laboratoire de routine → haut risque de contamination
- Poumon : sensibilité <<< car trapping ADN au niveau pulmonaire ⇔ cancers avec métastases os et cerveau (sein et prostate)

Etude rétrospective CHR Citadelle – Cancers colorectaux

- **Stades tumoraux**
  - 30 T4
  - 55 T3
  - 1 T2 – 1 T1 – (5Tx – 8 info non disponible)

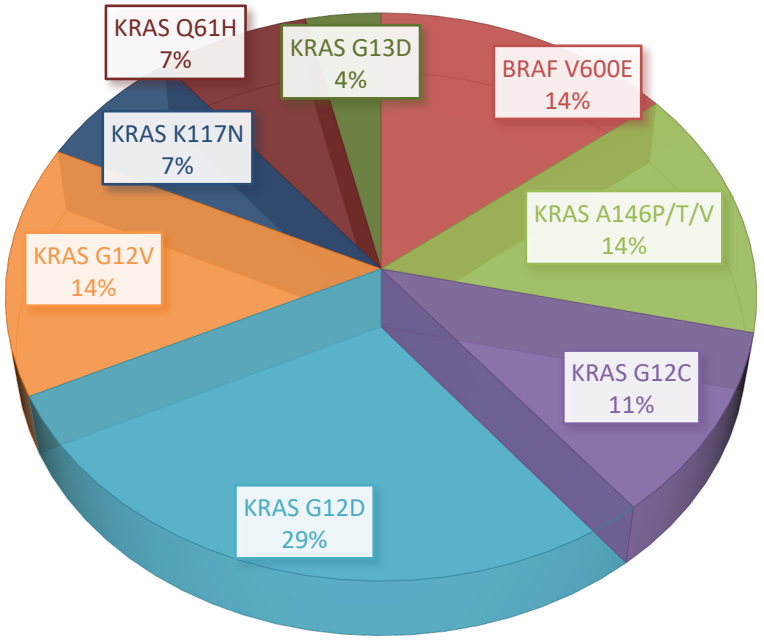
- **Concordance** résultats biopsie liquide et solide
  - 46 concordants
  - 39 résultats ≠ entre testing solide & liquide et informatifs
    - 5 néo-mutations KRAS signant une **résistance/un échappement thérapeutique** (KRAS G12D, G12V, 61H, A156T)
    - 28 biopsies liquides RAS Wild type avec tumeur solide KRAS muté : argument thérapeutique positif
    - 5 suivis péjoratifs :
      - Quantité d'ADN circulant dans l'échantillon augmentée corrélée à une **progression de la maladie**
  - 17 non applicables (statut tumeur solide RAS non disponible ou non connu)



Etude rétrospective CHR Citadelle – Cancers colorectaux

- **28 prélèvements/101** présentent une **mutation dans *KRAS* ou *BRAF***

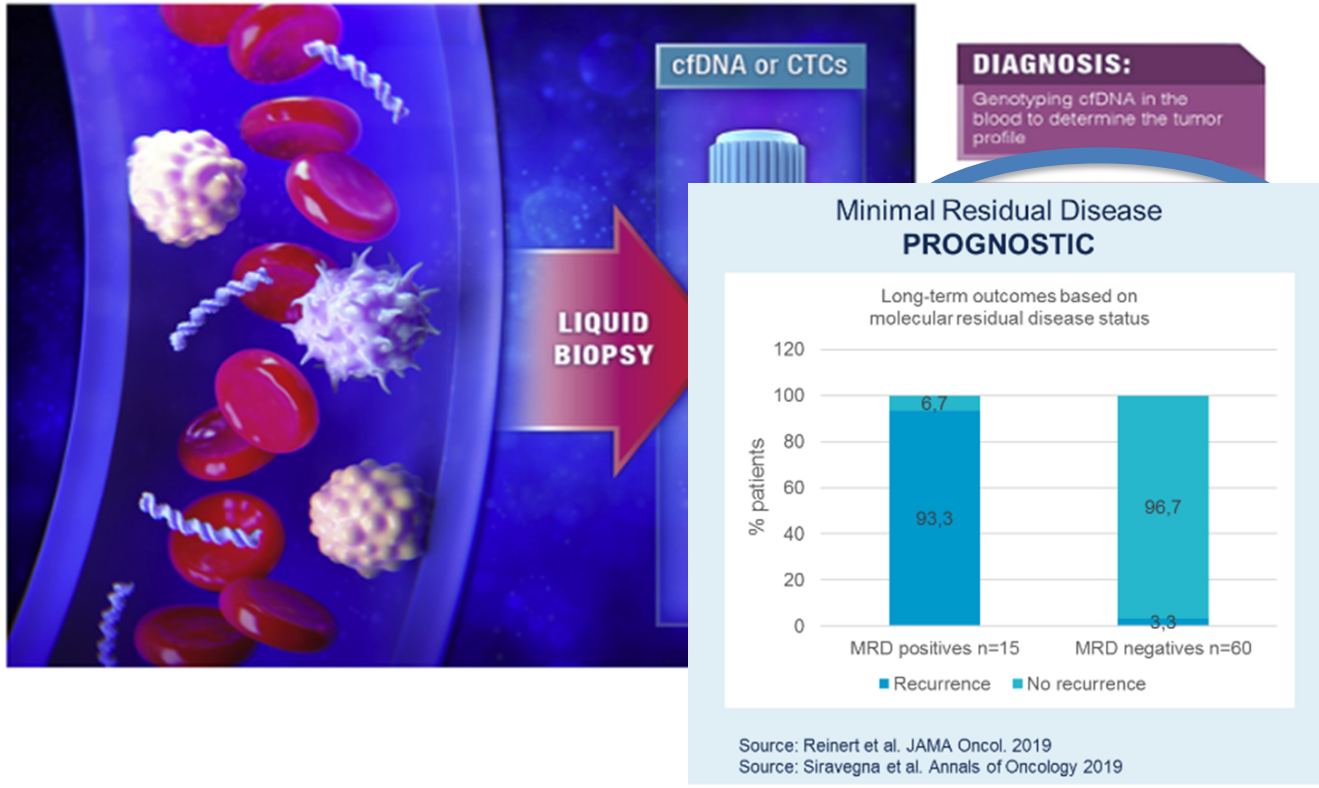
- **<u>Distribution des mutations :</u>**



Etude rétrospective CHR Citadelle – Cancers colorectaux

- **<u>Monitoring thérapeutique</u>** par résultats biopsie liquide

  - 8 patients : Eviter/arrêt anti-EGFR
  - 6 patients : Rechallenge avec anti-EGFR
  - 1 patient: immunothérapie (BRAF mutée)
  - 1 patient : pas de chimiothérapie adjuvante
  - 1 patient : Reprise Irinotecan/5-FU
  - 2 patients : proposition d'anti-VEGF



- 15 prélèvements réalisés après chirurgie de résection

  ➔ **3/15 : ADN Circulant présent et muté !** (*KRAS* G12V → mutations KRAS détectées dans l'ADN circulant en post-opératoire = Pronostic **défavorable** et en défaveur traitement court par chimiothérapie (Taieb J, ESMO 2019, Reinert T, JAMA oncol 2019). (*BRAF V600E*)

Biopsie liquide: nouveaux biomarqueurs ?

- Pour 10 patients/101 :

  - **Spécificité de l'ADN circulant >** à celles de CEA et/ou Ca19.9

    CEA, CA19,9

    - Néo-mutation KRAS avec taux de CEA sans fluctuations majeures dans les contrôles successifs
    - Mutation G12V circulante chez un patient avec métastases osseuses et pulmonaires ⇔ CEA normal !
    - Quantité d'ADN circulant en augmentation alors que CEA en diminution chez patiente avec infiltration néoplasique muscle iliaque droit
    - Mutation KRAS G12D circulante chez patient avec CEA et Ca19.9 normaux chez patient avec nouvelle métastase hépatique
    - Quantité d'ADN circulant en augmentation alors que CEA et Ca19.9 normaux chez patient avec lésion métastatique foie
    - RAS Wild Type avec CEA augmenté chez une patiente présentant une bonne réponse thérapeutique (décroissance masse hépatique sous Folfirinox)
    - RAS Wild type chez KRAS G12D solide alors que bilan radiologique (CT) négatif et clinique positifs
    - KRAS G12C chez patiente avec CEA et Ca19.9 normaux avec réponse partielle car fixation au PET Scan
    - …

- Pour 12 patients : Corrélation entre fluctuations taux ADN circulant et marqueurs tumoraux

- Un seul cas où CEA augmenté et BL négative chez patient BRAF V600E muté (mauvais pronostic) avec carcinomatose péritonéale

Cas cliniques intéressants

- Homme 53 ans
- **Août 2018**: Diagnostic adénocarcinome colique recto-sigmoidien + Métastases hépatiques
  - RAS Wild type et MSS sur FFPE
  - 20/08/2018: BL → RAS Wild type

  ➔ Chimiothérapie d'induction : Folfirinox et Panitumab (anti-EGFR)

  ➔ Embolisation veine porte + destruction lésion métastases hépatiques par radiofréquence

  ➔ Allègement de la chimiothérapie

  ➔ Hepatectomie droite mars 2019 puis résection lésion primitive août 2019

- **Octobre 2019**: récidive métastatique au niveau de la tranche de section et sur zone jouxtant site de radiofréquence sur le segment III.
  - Contrôle biopsie liquide post-chirurgie résection : 19/09/2019: RAS Wild type

  → Introduction 2 cures de chimiothérapie + Panitumab (anti-EGFR) car « *efficacité spectaculaire ces derniers mois* »

  → 20/12/2019: Résection récidive
  - Contrôle biopsie liquide post-chirurgie résection récidive : 20/01/2020: RAS Wild type et diminution de 6x quantité d'ADN circulant

  → Traduit évolution clinique favorable. Maintien sous Chimiothérapie adjuvant par Folfox 4 cures

Cas clinique n°1 (suite)

- **15 Juillet 2020 :** Patient toujours sous 5FU- Irinotécan et anti-EGFR
  - Evolution clinique favorable
  - CEA réduit
  - Contrôle biopsie liquide 15/07/2020: RAS Wild type

- *30/07/2021 :*
  - Apparition de douleurs sacrées, pelviennes, avec irradiation membre inférieur droit (post allègement chimiothérapie)
  - Contrôle biopsie liquide 30/07/2021: **Néo-mutation KRAS Q61H → prédictives de résistance par anti-EGFR**.
  - **CT & PET-CT** 30/07/2021 : augmentation atteinte sacrée et hépatique

    ➔ ~~anti-EGFR~~ → Radiothérapie sur sacrum (symptomatique) anti-angiogénique (Avastin)

Cas clinique n°2

- Femme de 67 ans
- Adénocarcinome peu différencié et infiltrant pT3N2 opéré le 06/05/2020 → **Muté BRAF V600E** et **MSI-High**
- **08/05/2020** : BL : **BRAF V600E**

→ Chimiothérapie adjuvante

- **16/07/2020** : Après une première cure de chxthérapie : BL : **BRAF V600E**

➔ Marqueur tumoral et scanner abdomino-pelvien à moitié de chxthérapie (post 6 cures)
➔ CT-thorax 18/11/2020 : négatif
➔ CEA 13/11/2020: 5,6 µg/l (VN <5); CA19,9 56 kU/l (VN <35)

- **26/11/2020** : **BRAF V600E** quantité d'ADN circulant en légère augmentation

- **04/05/2021 : PET-CT :** adénopathies métastastiques inter-aortico-cave, lombo-aortique, pré-cave

➔ Vu récidive ganglionnaire précoce et MSI et BRAFV600E dans BL → Immunothérapie

- **03/06/2021** : **BRAF V600E** quantité d'ADN circulant stable, bonne tolérance à l'immunothérapie

- **27/08/2021** : BRAF WT

Biopsie liquide plus précoce que radiographie ?

- Patient 1

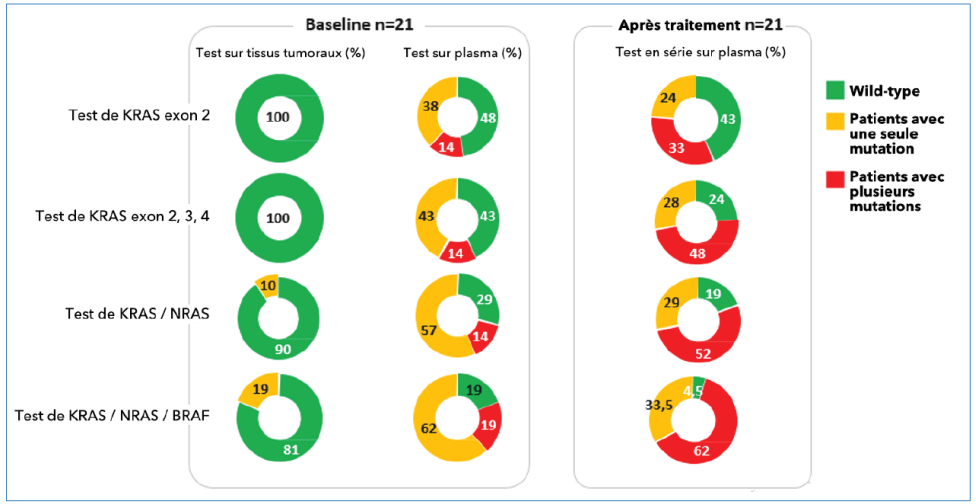
  - **CT scanner thoraco-abdominal 30/06/2020** : Evolution favorable (régression lésions tumorales de façon diffuse).
  - **01/07/2020** : Diminution nette du CEA
  - BL : **09/07/2020** : **Réapparition de la mutation KRAS G12D**. Patient sous Folfirinox – Anti-VEGF du 09/07/2020 jusqu'au 20/08/2020)
  - CT SCAN thoraco-abdominal **24/08/2020**: majoration ensemble lésions métastatiques hépatiques → Mise sous anti-TKI (Regorafenib)

- Patient 2
  - BL : **07/08/2020 : Néomutation KRAS K117N**
  - **CT scanner thoraco-abdominal 29/07/2020** : pas de modification thoracique. Stéatose hépatique sur site de métastectomie lobe hépatique droit
  - **PET-CT 18/08/2020** : mise en évidence de volumineuses lésions hypermétaboliques hépatiques d'allure métastasique

Conclusions biopsie liquide

- Outil facile d'accès
- Surveillance DYNAMIQUE des changements moléculaires de la tumeur au cours du traitement

Figure 1. Distribution du statut des mutations RAS / BRAF à partir de l'analyse de l'ADNlc avant et après traitement par anticorps anti-EGFR.[5]
Traduit de la référence [5], Clin Cancer Res, 2017, 23, 4578-4591, Thierry et al, Circulating DNA demonstrates convergent evolution and common resistance mechanisms during treatment of colorectal cancer, avec permission de l'AACR.



- Détection de l'HETEROGENEITE TUMORALE ➔ caractérisation + COMPLETE du profil moléculaire → Ligne directrice thérapeutique

- Informations sur métastases PRECOCES ⇔ biopsies tissulaires (SSI tumeurs déjà détectées par imagerie ou autre)

- Participation à surveillance des récidives

- Information sur MRM et métastases pas encore détectées ➔ intérêt PRONOSTIC

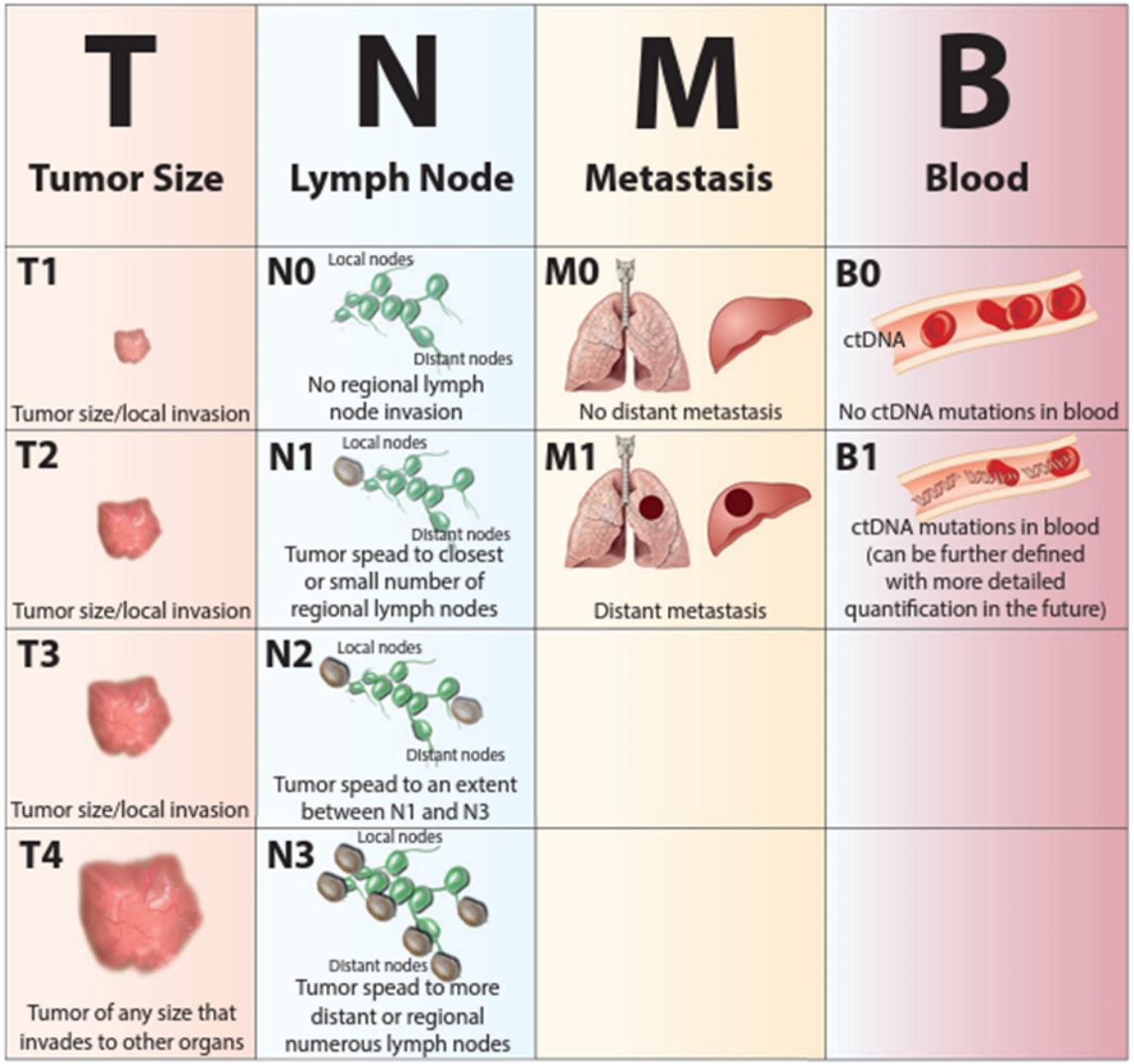
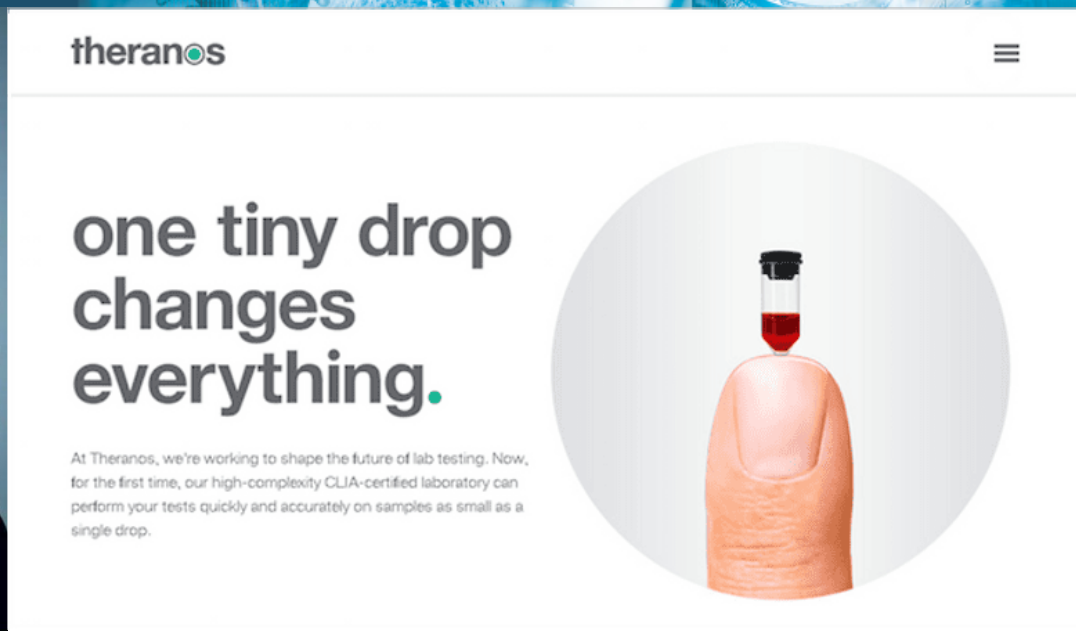


Figure 3. Generalized overview showing the proposed ctDNA incorporation into the hallmark cancer staging system as TNMB. Each categorical column indicates the anatomical valuation criteria by row for advancing cancer stage, thus reflecting tumor progression. Advancing genomics technologies promise to reveal this previously hidden anatomical indicator—ctDNA— to more accurately stage and treat cancers. Information for TNM staging in this figure derived from the *TNM Classification of Malignant Tumours* by UICC (7th Edition) [103].

Incorporating blood-based liquid biopsy information into cancer staging: time for a TNMB system?

M. Yang[1,2,3,4], M. E. Forbes[1,2], R. L. Bitting[1,5], S. S. O'Neill[1,6], P.-C. Chou[1,2], U. Topaloglu[1,2], L. D. Miller[1,2], G. A. Hawkins[1,7], S. C. Grant[1,5], B. R. DeYoung[1,6], W. J. Petty[1,5], K. Chen[3,4*], B. C. Pasche[1,2,5] & W. Zhang[1,2*]



Ceci n'est pas une *biopsie liquide*

La Biopsie liquide est complémentaire aux biopsies tissulaires car :

« *Peu importe le flacon, pourvu qu'on ait l'ivresse* » c'est-à-dire

« *Peu importe le tissu pourvu qu'on ait le bon diagnostic* ! »

Dr. C. Sibille (2017)