

Biopsie liquide

Comment identifier des mutations sur des longs gènes suppresseurs de tumeur sur l'analyse en ADNtc ?

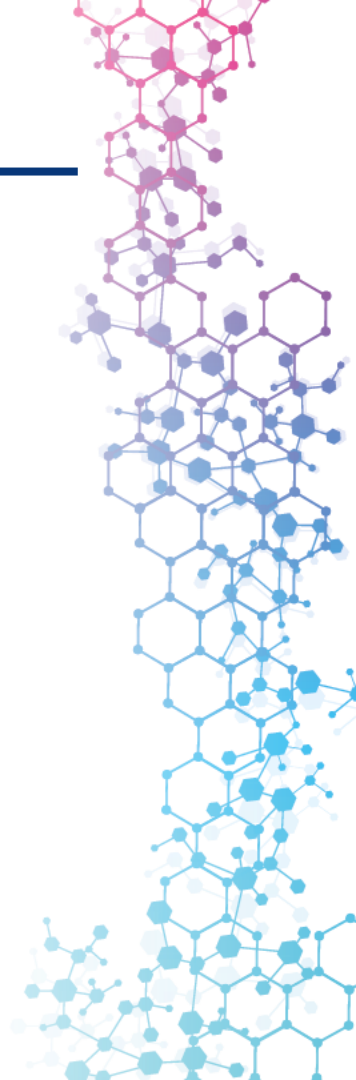
Dr Etienne ROULEAU

Gustave Roussy, Villejuif

Modération : Pr Alexandre HARLE

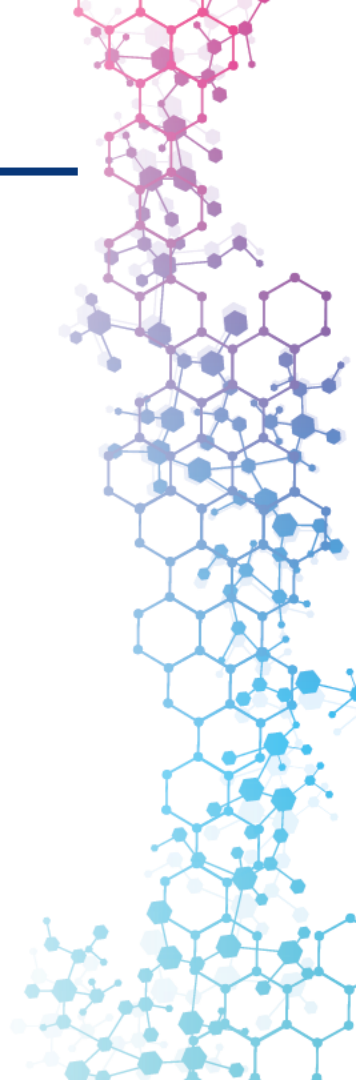
LIENS D'INTÉRÊT

- **Participation à des boards à l'étranger: AstraZeneca – BMS**
- **Financement recherche: AstraZeneca**
- **Participation à des boards : Roche – GSK – Clovis – BMS – Roche**
- **Non financier : président du GFCO – administrateur de l'IQNPPath – Gen&tiss – secrétaire de la FFGH**

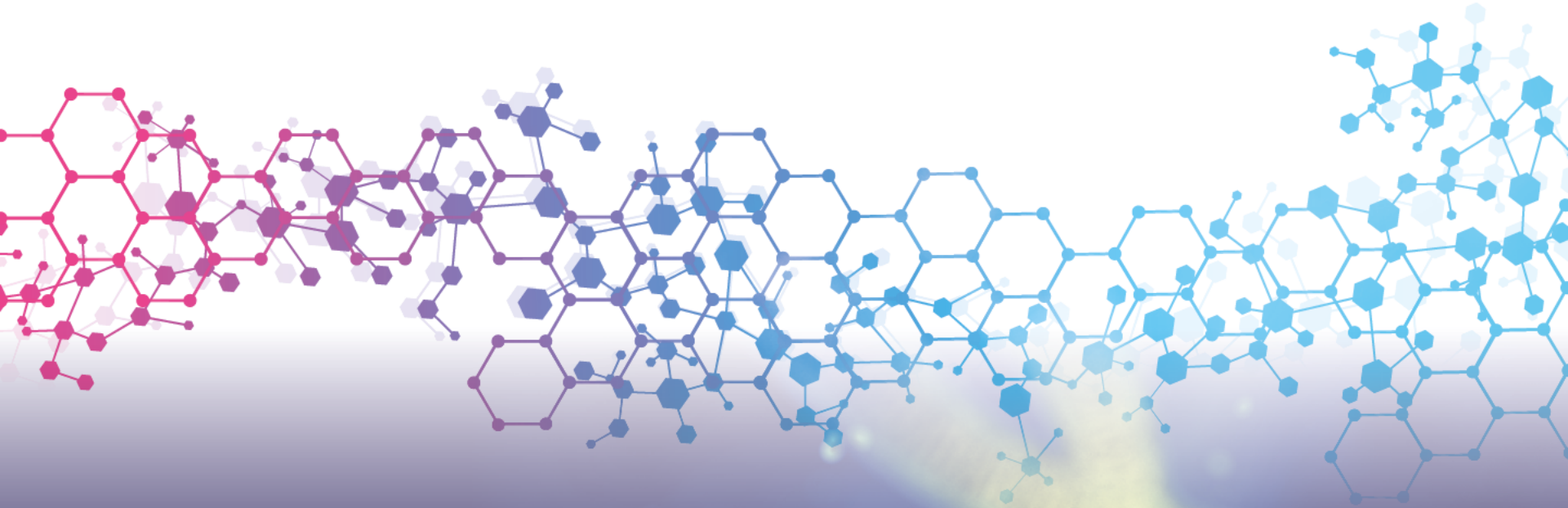


Expérience ADNct

- Mise en place d'un panel 109 gènes pour ADN circulant
- Evaluation de pipeline interne / SophiaGenetics
- Utilisation de l'approche FMI CDx depuis 2 ans
- Participation aux RCPM hebdomadaires de Gustave Roussy



Enjeux - sensibilité



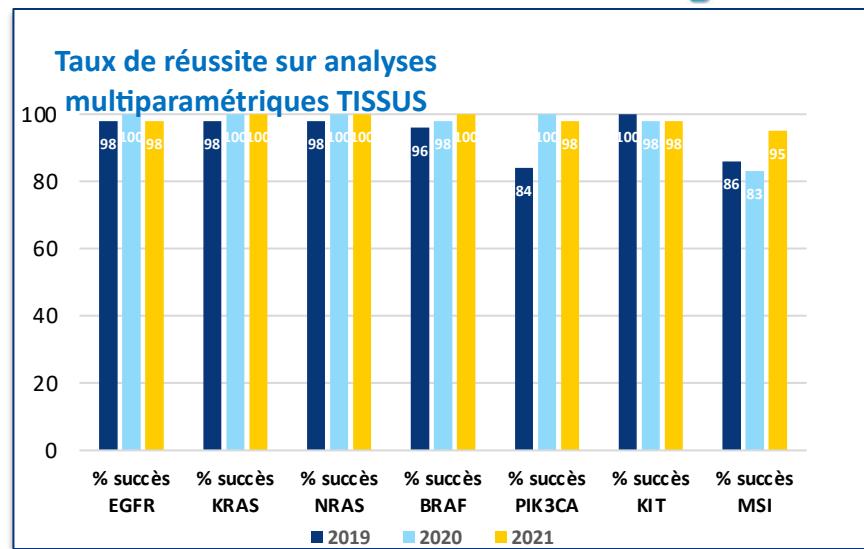
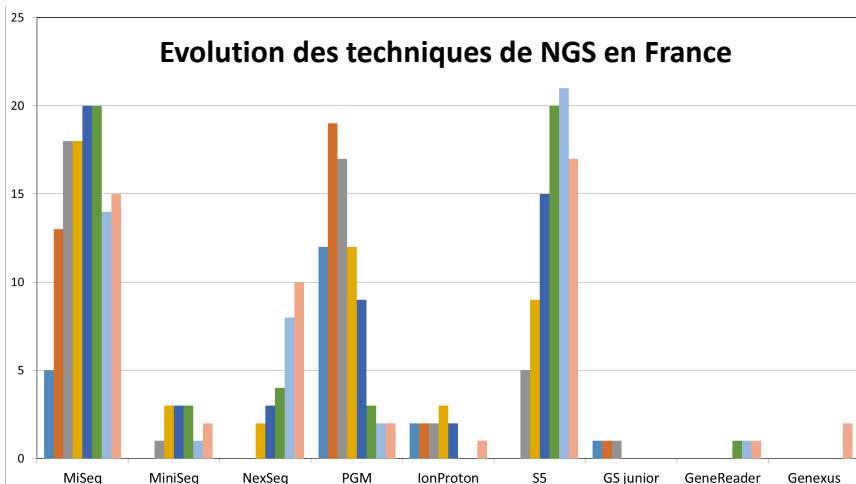
Avec la participation
scientifique du



Enjeux

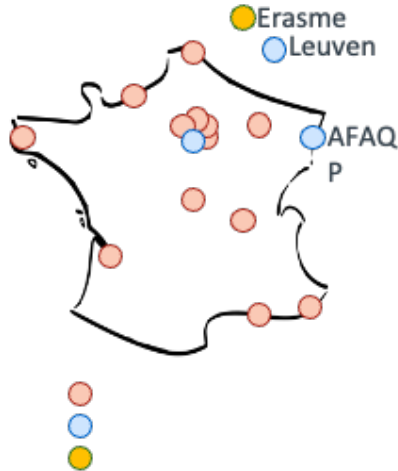
- **Difficulté sur la sensibilité des panels**
 - ADN circulant
 - Faible fréquence allélique
 - Programmes Gen&tiss – variants à 5 % sur *BRCA1/BRCA2*
- **Amélioration des techniques et des capacités NGS**

gen&tiss

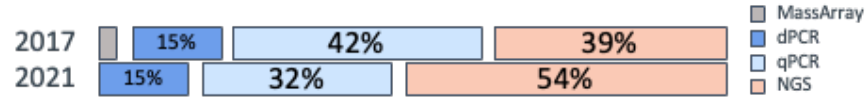


De plus en plus de NGS

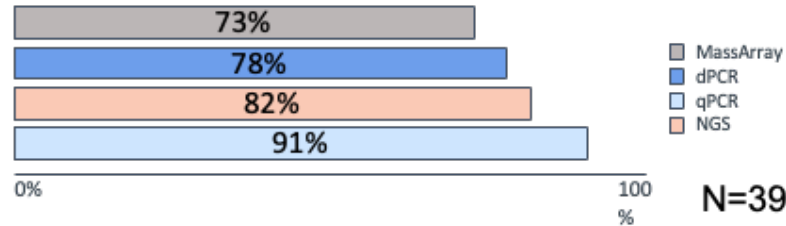
Performance encore à améliorer



Methods in use for ctDNA analysis, between 2017 and 2021



Average true-positive rate per analysis method over the period



ctDNA extraction methods have been diversified, but some are associated with poorer sensitivity. Despite better analytical performance, the use of qPCR for ctDNA analysis is tending to decrease in favour of NGS, as the number of target mutations increases.

Gènes suppresseurs et théranostique/diagnostique



Annals of Oncology

Advanced non-squamous NSCLC	STK11 / KEAP1
	No
Advanced breast cancer	BRCA1/BRCA2
	PTEN
	RB1
	TP53
	CDH1
	PALB2
Colorectal cancer	APC
	MMR
	POLE
Advanced prostate cancer	BRCA1/BRCA2
	ATM
	PTEN
	PALB2
	APC
Advanced gastric cancer	MMR
	CDH1
	No
Pancreatic cancer	BRCA1/BRCA2
	PALB2
Ovarian cancer	TP53
	BRCA1/BRCA2
Endometrial cancer	TP53
	MMR
	POLE

VERT : utilité théranostique / pronostique – JAUNE : utilité diagnostique

D'après Mosele, F., J. Remon, J. Mateo, C. B. Westphalen, F. Barlesi, M. P. Lolkema, N. Normanno, et al. « Recommendations for the Use of Next-Generation Sequencing (NGS) for Patients with Metastatic Cancers: A Report from the ESMO Precision Medicine Working Group ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 24 août 2020.

A. Bayle et al.

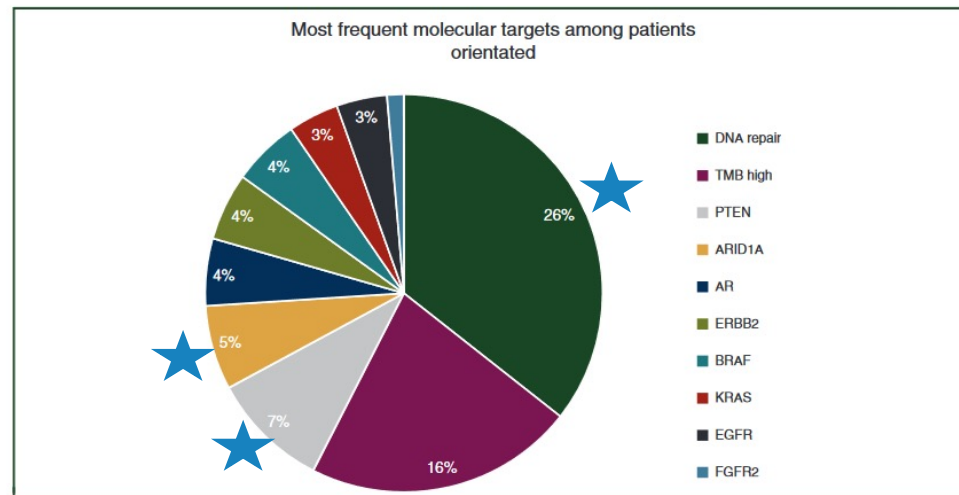
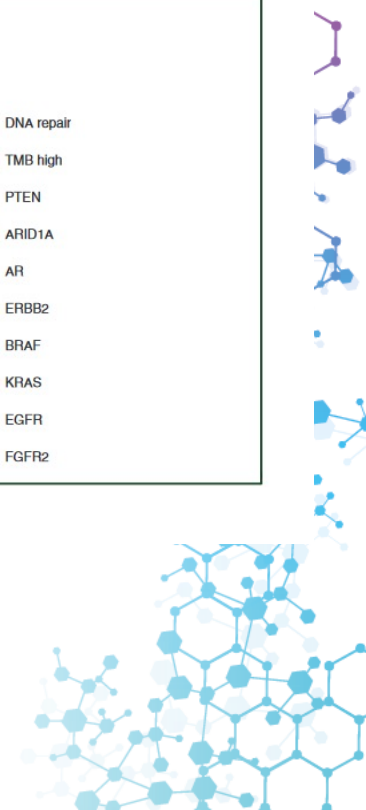


Figure 2. Most frequent molecular targets among patients orientated. TMB, tumor mutational burden.

Bayle, A., L. Belcaid, M. Aldea, D. Vasseur, F. Peyraud, C. Nicotra, A. Geraud, et al. « Clinical Utility of Circulating Tumor DNA Sequencing with a Large Panel: A National Center for Precision Medicine (PRISM) Study ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 34, n° 4 (avril 2023): 389-96.



Gènes suppresseurs et maladies constitutionnelles

Annals of Oncology

Special article

Box 1. Recommendations for genes to be included for germline-focussed analysis and triggering of germline sample laboratory confirmation

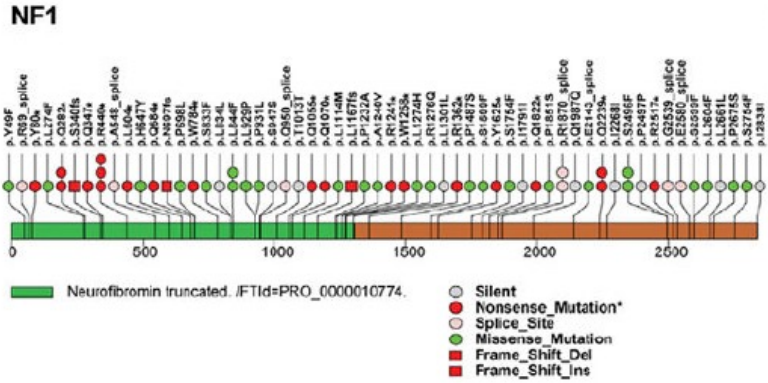
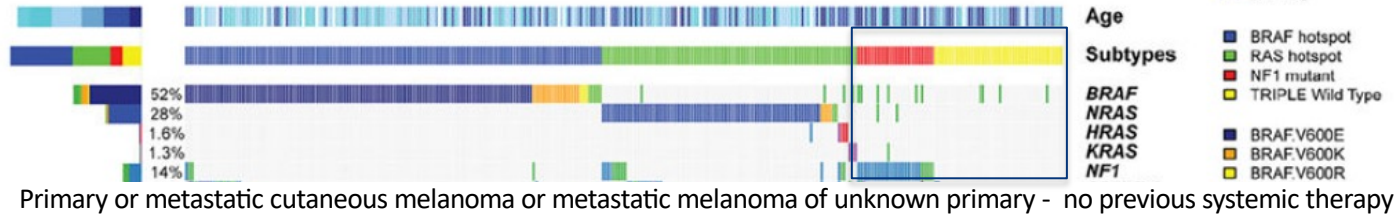
	Any tumour type	Associated tumour type only
Tumour arising any age	<i>BRCA1</i> <i>RAD51C</i> <i>BRCA2</i> <i>RAD51D</i> <i>BRP1</i> <i>RET</i> <i>MLH1</i> <i>SDHA</i> <i>MSH2</i> <i>SDHAF2</i> <i>MSH6</i> <i>SDHB</i> <i>PALB2</i> <i>SDHC</i> <i>PMS2</i> <i>SDHD</i> <i>VHL</i> ^a <i>TSC2</i> <i>MUTYH</i> ^b	<i>FLCN</i> <i>FH</i> <i>BAP1</i> <i>POLE</i>
Tumour arising age <30 only	<i>RBI</i> <i>APC</i>	<i>TP53</i> ^c <i>NF1</i>

^aRenal tumours to be excluded.

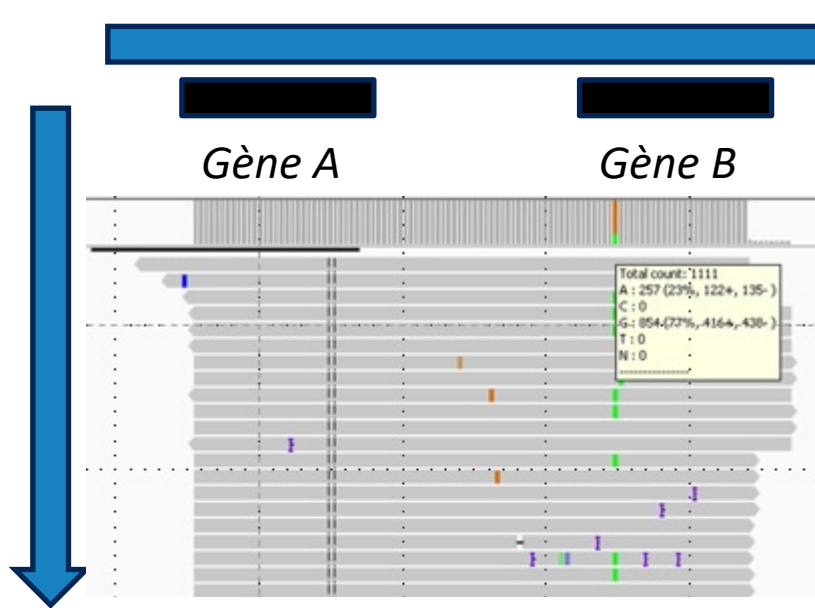
^b*MUTYH* should be included for germline-focussed tumour analysis but reporting and germline follow-up testing should only be performed on detection of two pathogenic variants.

^cBrain tumours to be excluded.

Gènes suppresseurs et compréhension tumorale

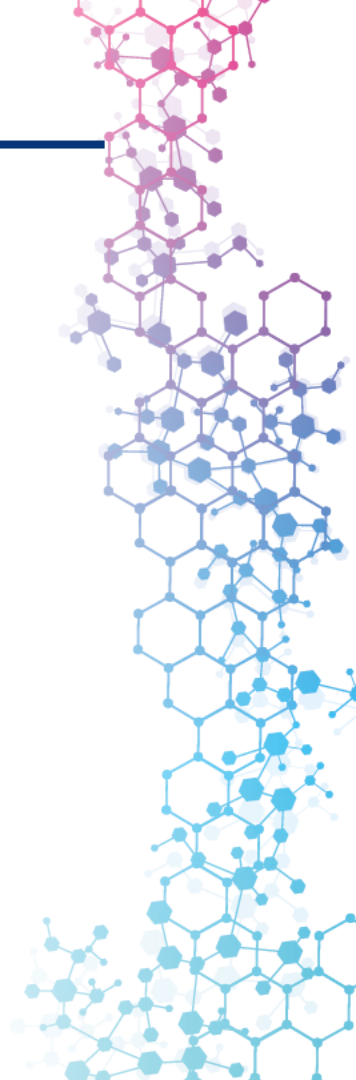


Equilibre entre la taille et la profondeur



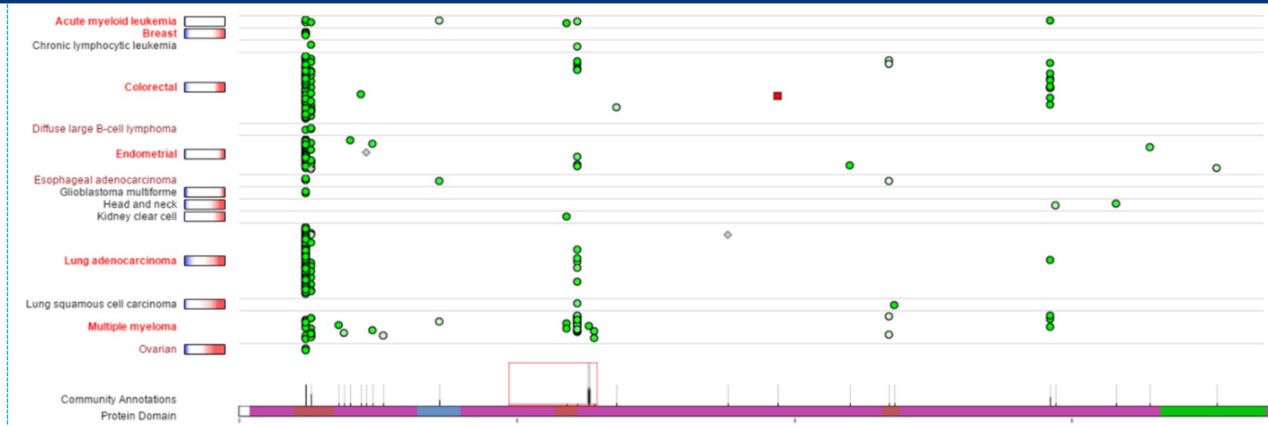
Limite du NGS :
Taux d'erreur – 0,1-1,5 % par base

- Taille optimale du panel
- Profondeur minimale nécessaire
- Homogénéité de couverture

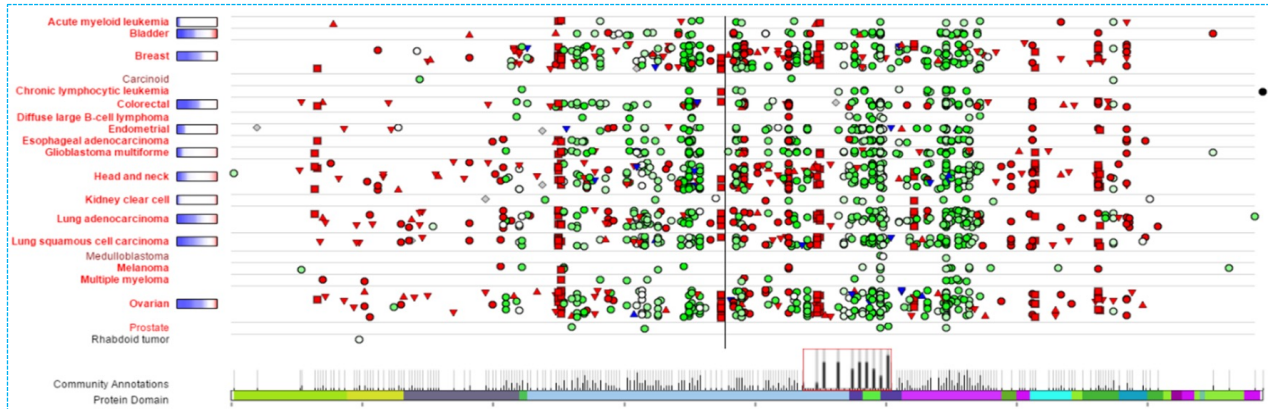


Les gènes suppresseurs ne sont pas des oncogènes

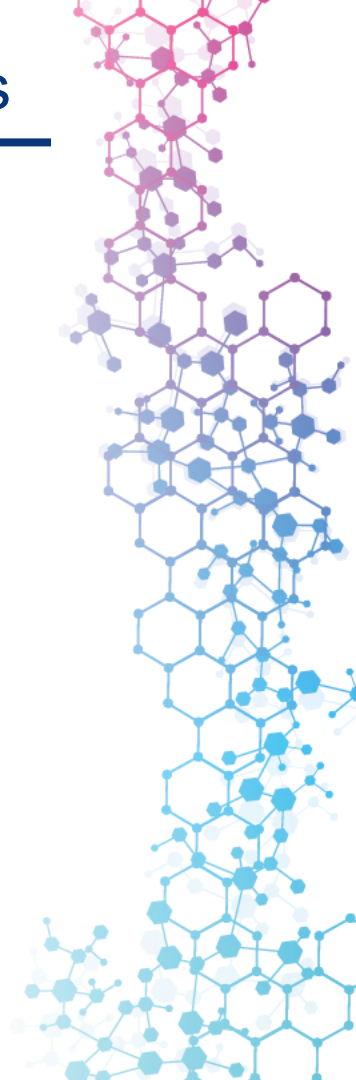
KRAS



TP53

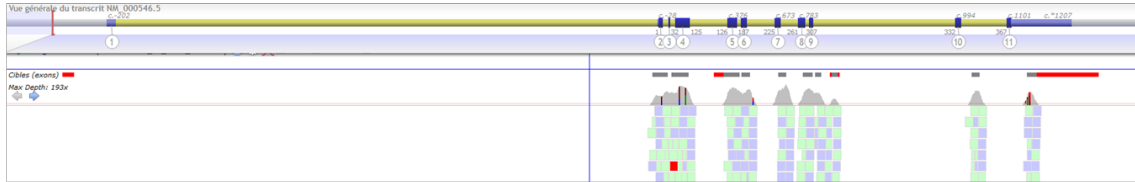


<http://www.tumorportal.org/>

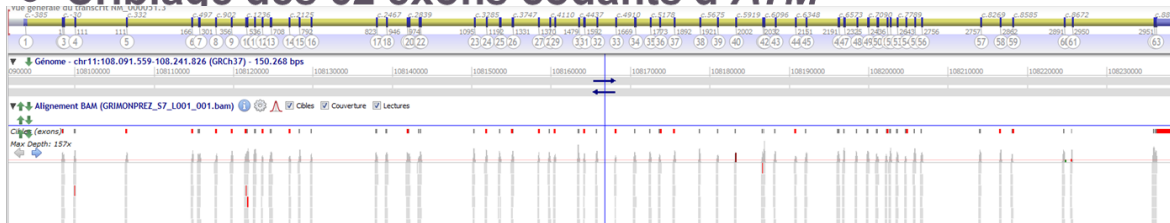


Taille des gènes

● Criblage des 10 exons codants de *TP53*



● Criblage des 62 exons codants d'*ATM*

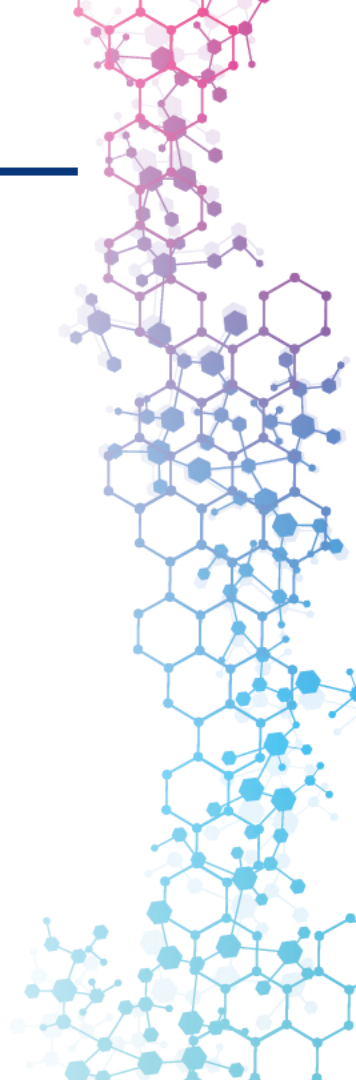


Visualisation : Alamut®

<i>BRCA2</i>	14466
<i>BRCA1</i>	9448
<i>ATM</i>	11651
<i>NF1</i>	10840
<i>APC</i>	9530
<i>CREBBP</i>	8879
<i>ARID1A</i>	7658
<i>DICER1</i>	6809
<i>SMARCA4</i>	6440
<i>FANCA</i>	6088
<i>CDK12</i>	5033
<i>MSH6</i>	4883
<i>RAD51D</i>	4866
<i>BRIP1</i>	4510
<i>MSH2</i>	4208
<i>PALB2</i>	4081
<i>RB1</i>	3867
<i>MLH1</i>	3791
<i>PMS2</i>	3789
<i>RAD51C</i>	3526
<i>CDH1</i>	3289
<i>NBN</i>	2905
<i>BAP1</i>	2870
<i>TP53</i>	2835

Questions

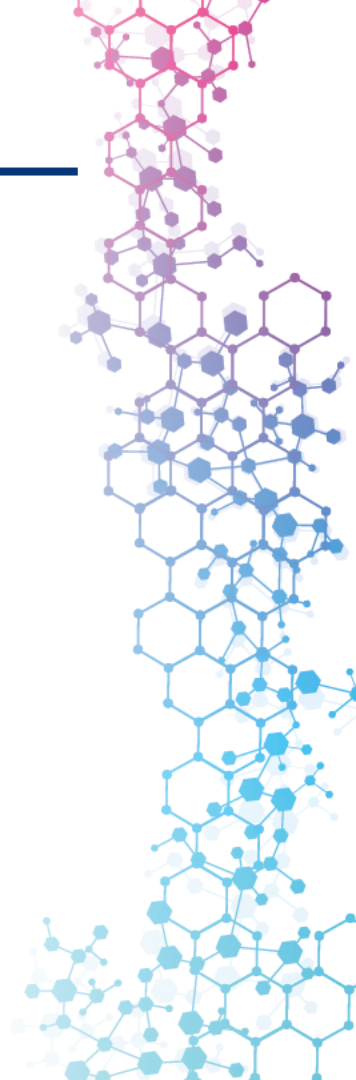
Quels sont les utilisateurs de grands panels en ADN circulants ?



Questions

Quel séquenceur ?

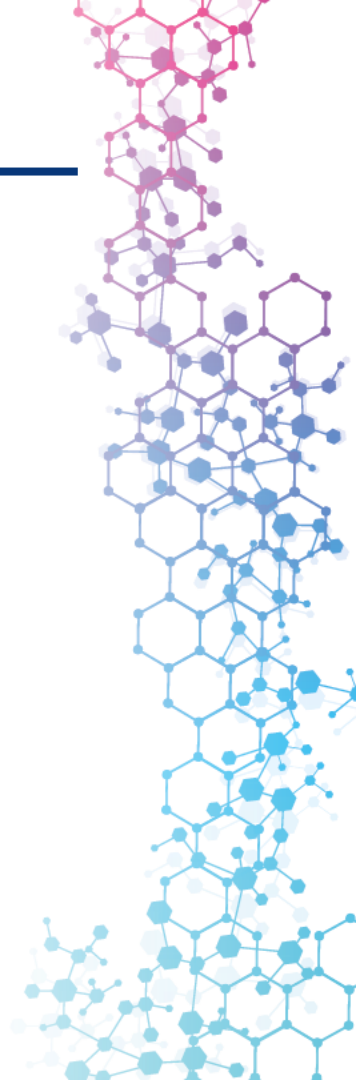
- S5
- NextSeq 550
- NextSeq 2000
- NovaSeq 6000
- NGS 3^{ème} génération - Oxford Nanopore / PacBio



Questions

Quel pipeline est utilisé ?

- **Interne**
- **SophiaGenetics**
- **SeqOne**



Mise en place d'un panel

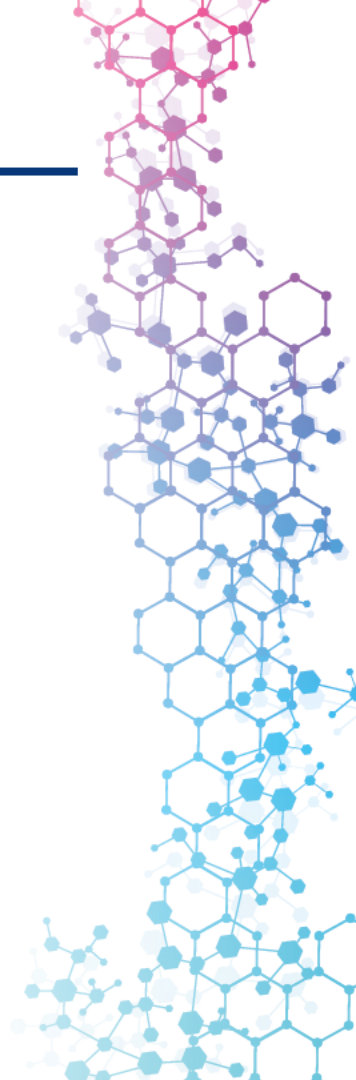


Avec la participation
scientifique du



Outils disponibles

- **Technique NGS**
 - Capture
 - PCR – impact des faux positifs ?
- **Taille du panel / capacité des séquenceurs**
- **Choix des gènes**
- **Pipelines informatiques**

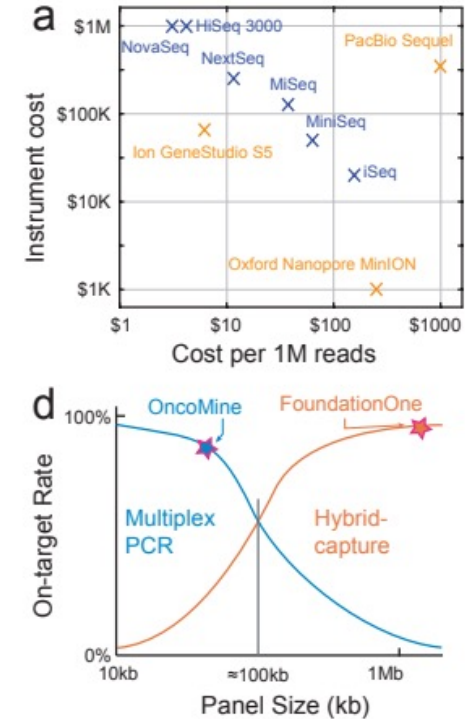


Choix des techniques et des panels

Impact sur le coût

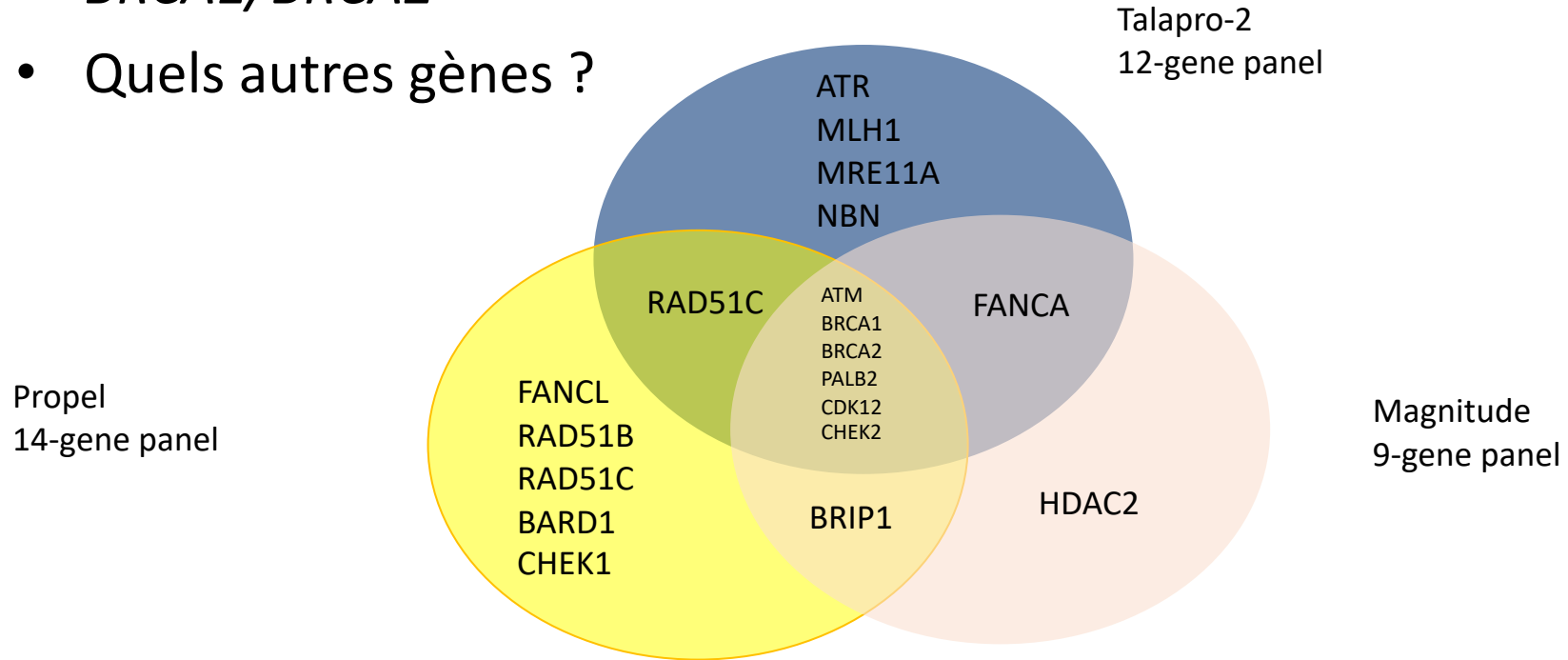
Flowcell	NextSeq 500/550		NovaSeq			
	Mid-Output 300c	Hi-Output 300c	SP 300c	S1 300c	S2 300c	S4 300c
Clusters per FC (M reads)	130	400	800	1600	4100	10000
GB per FC	39	120	240	500	1250	3000
Cost per FC (EUR)	€ 1 886	€ 4 872	€ 2 886	€ 5 050	€ 9 235	€ 13 465
Nombre d'échantillon à 300X 109 gènes sans Backbone V7 365.752 kbp	32	96	192	384	960	1920
Nombre d'échantillon à 3000X pour cfDNA 109 gènes sans Backbone V7 365.752 kbp	3	8	19	38	96	192
Coût de séquençage par échantillon	€ 629	€ 609	€ 152	€ 133	€ 96	€ 70

Tableau : évaluation du coût du séquençage par échantillon pour un grand panel de 109 gènes (0,3kb).



Choix des gènes – exemple d'un panel prostate

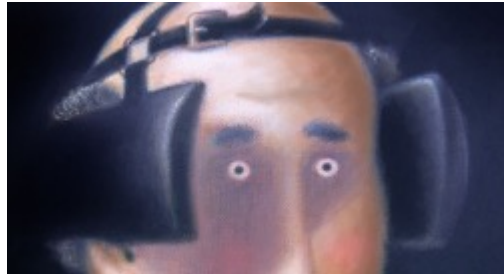
- *BRCA1/BRCA2*
- Quels autres gènes ?



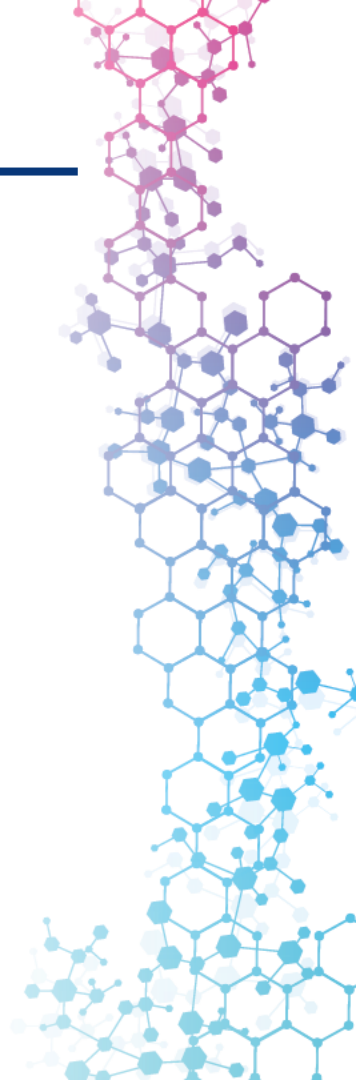
Choix des gènes – exemple d'un panel prostate

- *ATM*
 - *BRCA1*
 - *BRCA2*
 - *PALB2*
 - *CDK12*
 - *CHEK2*
 - *BRIP1*
 - *RAD51C/D*

 - Optional : AR / MMR genes / MSI / APC
- Green:** real HR pathway gene



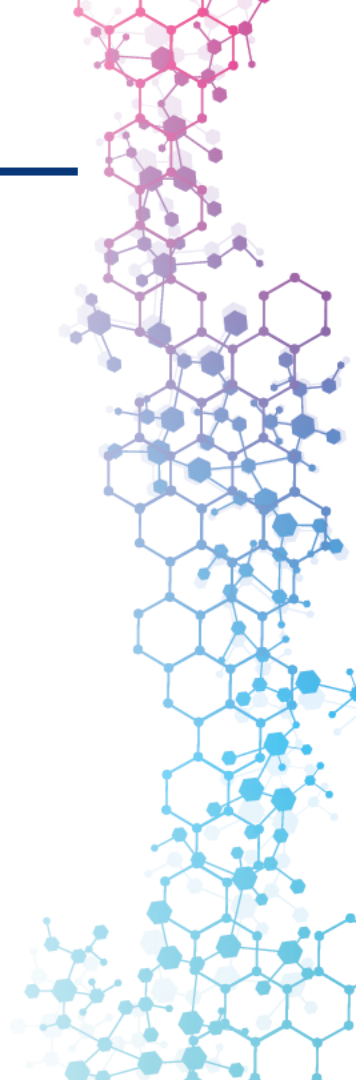
BRCA1/BRCA2



Question

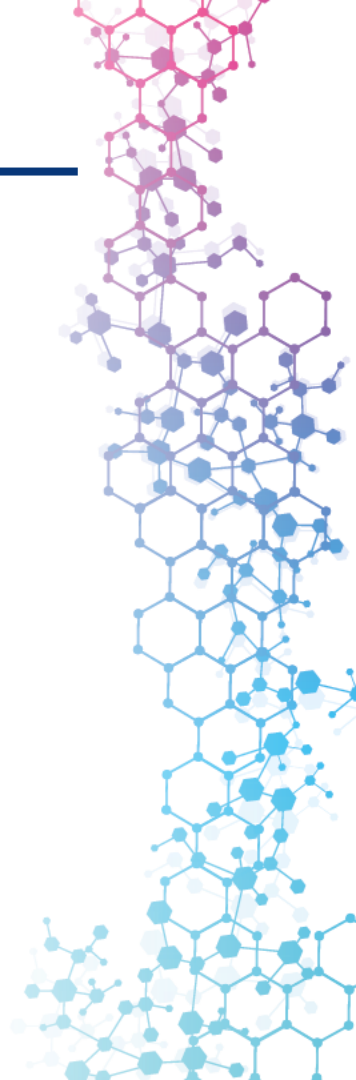
Quelles sont les gènes suppresseurs mis sur les panels ctDNA ?

- 1) *TP53*
- 2) *BRCA1/2*
- 3) *APC*
- 4) *ATM*
- 5) *PTEN*
- 6) *STK11*
- 7) *MMR*

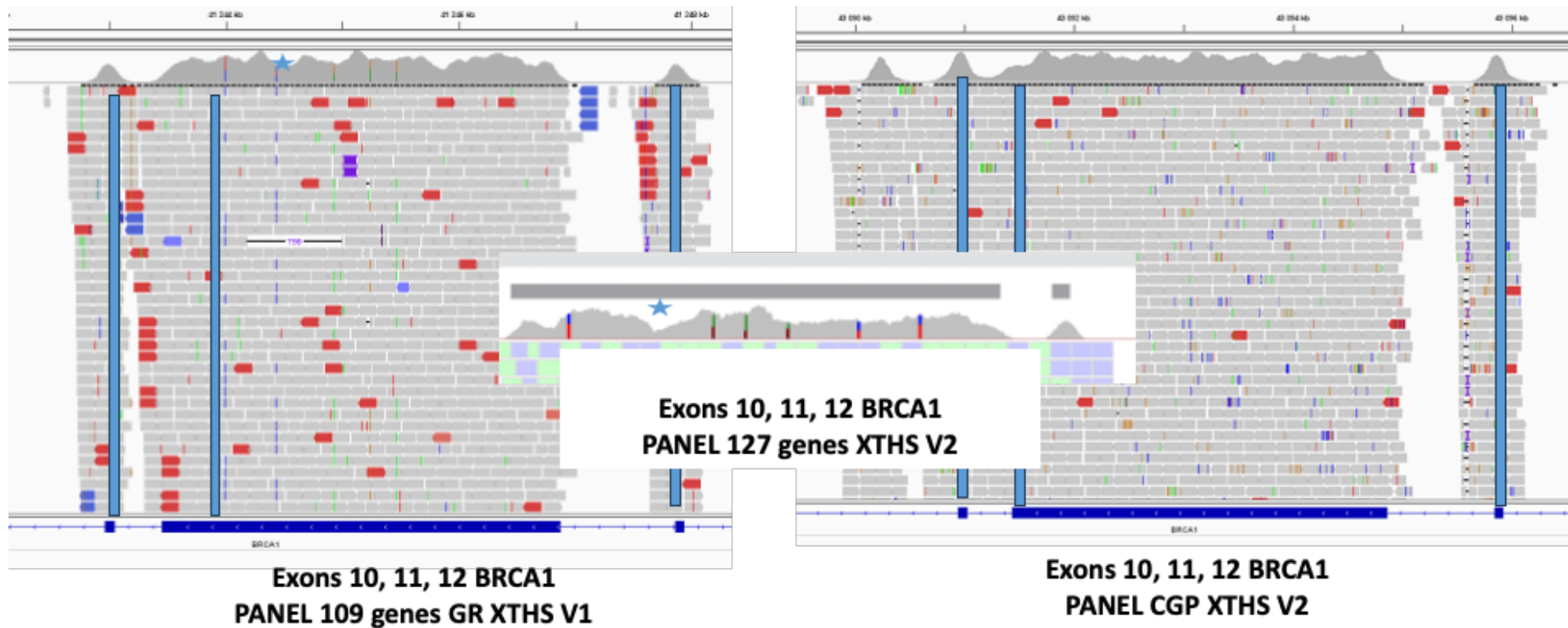


Régions à couvrir

- **Altération sur l'ensemble du gène**
 - Couvrir tous les exons
 - Régions introniques
- **Exception : gènes suppresseurs avec des hotspots**
 - *POLE*
 - *POLD1*
- **Importance de l'homogénéité de couverture**



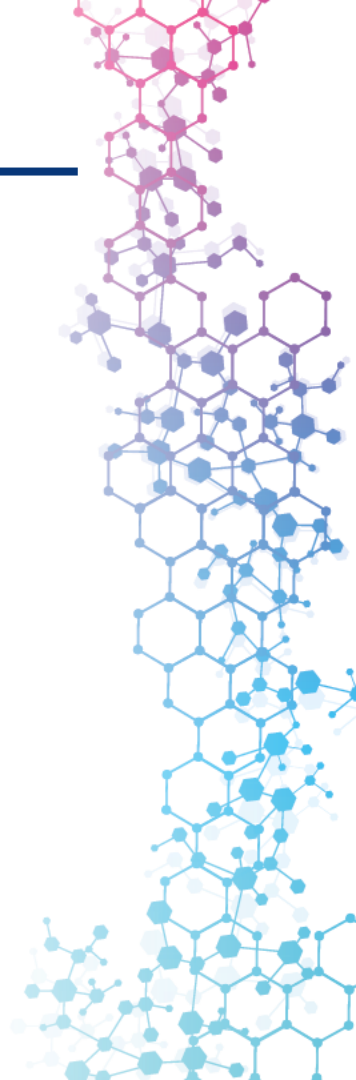
Importance de la couverture des grands gènes



Comment gagner en sensibilité ?

Approches

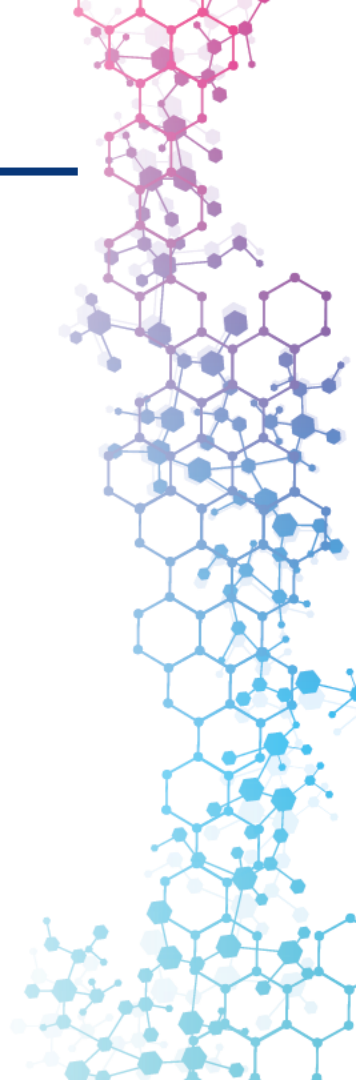
- Approche statistique et informatique
- Modification du protocole d'enrichissement
- Utilisation de séquence barre code moléculaire



Question

Quelles sont les stratégies d'amélioration des performances ?

- 1) Pipeline dédié
- 2) Utilisation des UMI
- 3) Séquençage dédié
- 4) Préparation dédiée des bibliothèques



Intérêt des UMI

- En fonction de la quantité de molécules
- Réduction du bruit de fonds

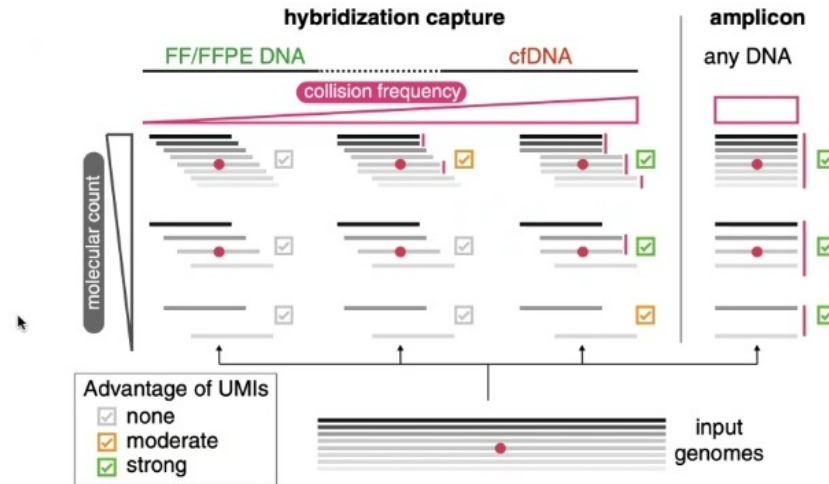
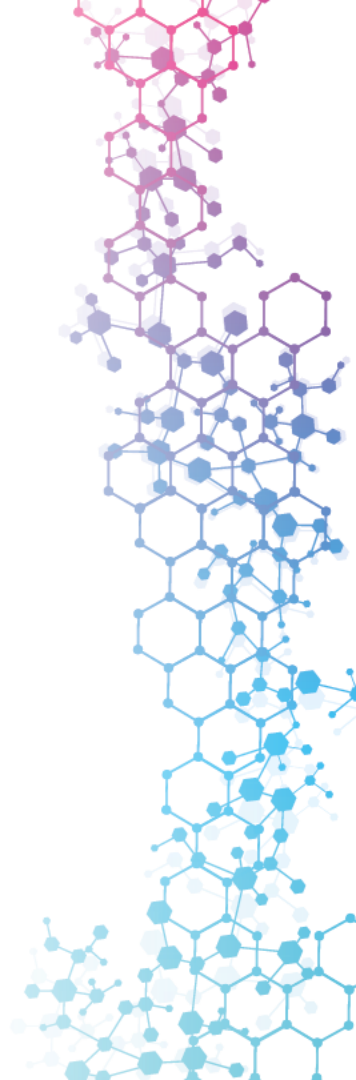


Fig. 5 Advantage of using UMIs in various experimental setups. Schematic summary of experimental setups where UMIs provide advantage in performance over the mapping position-based grouping; for the same set of input genomes, benefit of using UMIs will depend on the collision frequency (determined by sequenced fragment end distribution) and the molecular count (determined by input amount, LCR and sequencing depth)

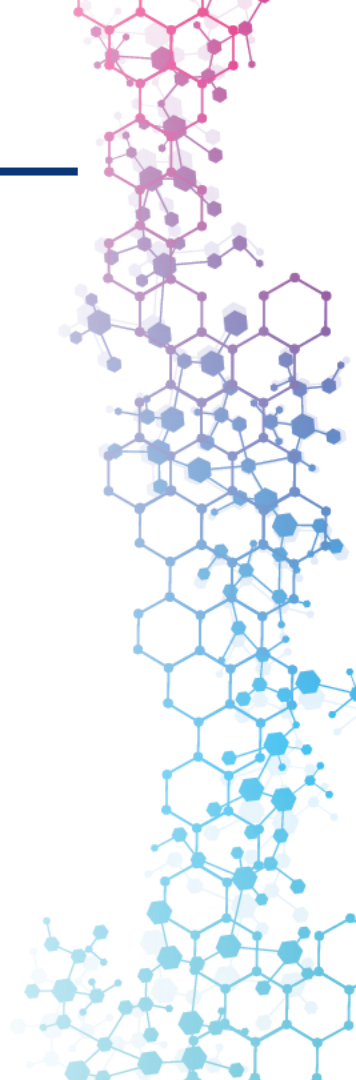
Bieler, Jonathan, Slawomir Kubik, Morgane Macheret, Christian Pozzorini, Adrian Willig, et Zhenyu Xu. « Benefits of applying molecular barcoding systems are not uniform across different genomic applications ». *Journal of Translational Medicine* 21, n° 1 (5 mai 2023): 305.



Question

Quelle est la profondeur minimale pour étudier les gènes suppresseurs en ADN circulant ?

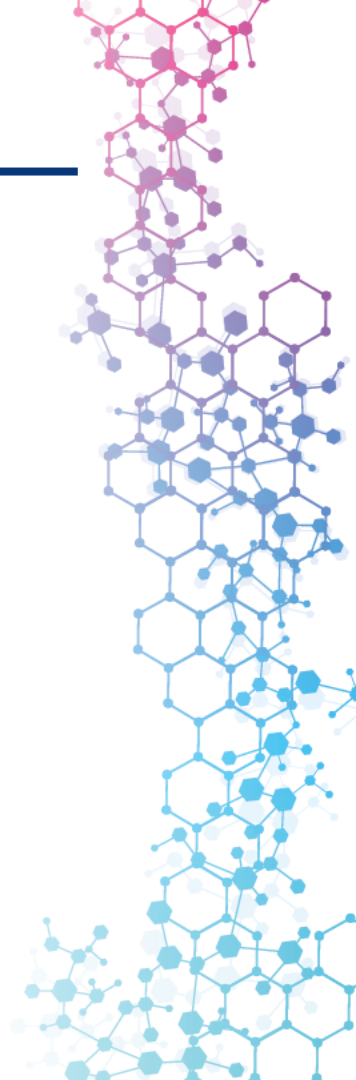
- 1) 1000X
- 2) 2000X
- 3) 5000X
- 4) 10 000X



Question

Quelle est la limite de détection acceptable pour les gènes suppresseurs en ADN circulant ?

- 1) 5 %
- 2) 2 %
- 3) 1 %
- 4) 0,5 %
- 5) 0,1 %



Capacité à détecter des altérations

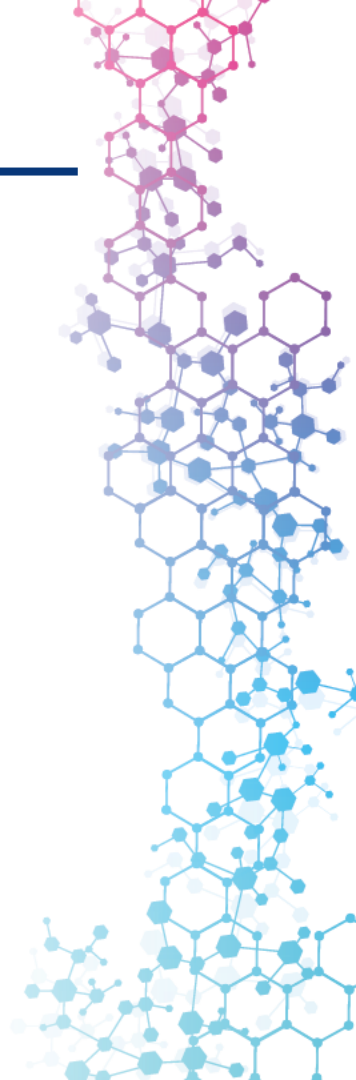


Avec la participation
scientifique du



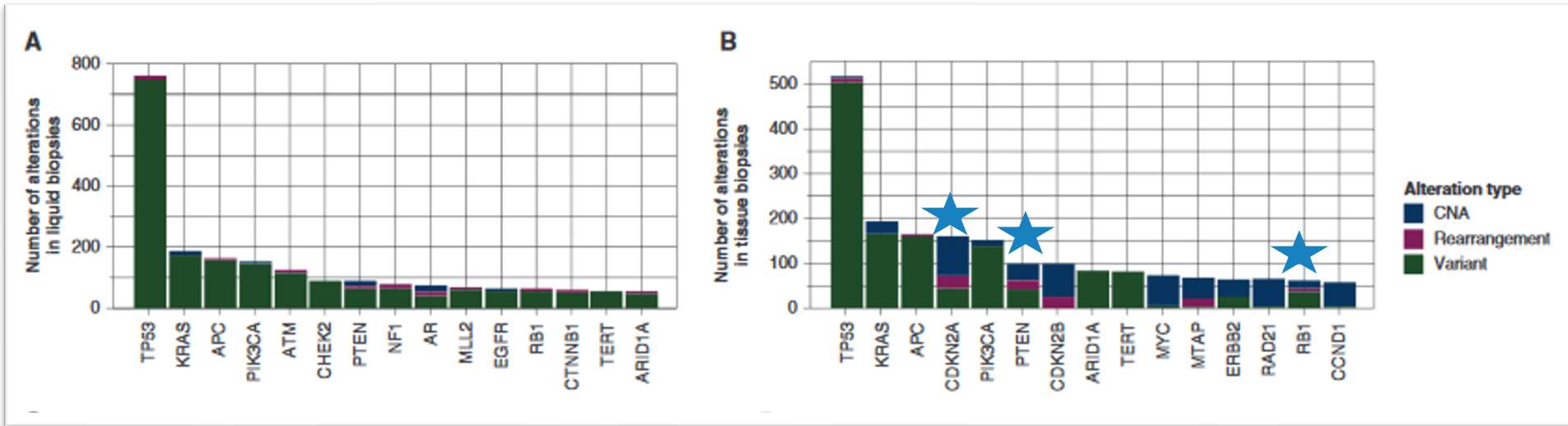
Types d'altérations

- **Variants ponctuels**
- **Insertion délétion**
- **Grands réarrangements**
- **Insertion Alu**
- **Délétion totale – focale ou chromosomique**
- **Régions répétées**
- **Région intronique et non codante**



Défaut de détection par rapport au tissu

Limite de détection des CNV / RGT



Bayle, A., L. Belcaid, M. Aldea, D. Vasseur, F. Peyraud, C. Nicotra, A. Geraud, et al. « Clinical Utility of Circulating Tumor DNA Sequencing with a Large Panel: A National Center for Precision Medicine (PRISM) Study ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 34, no 4 (avril 2023): 389-96.

Détermination du mécanisme d'inactivation

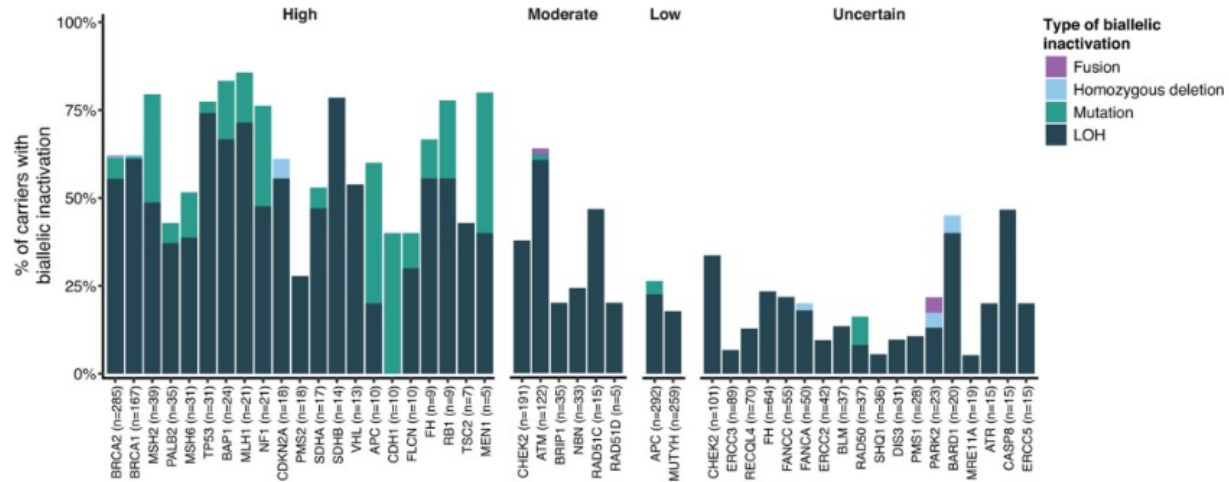
Limites

■ Détermination de l'inactivation

- Mutation
- Délétion homo
- LOH
- Fusion

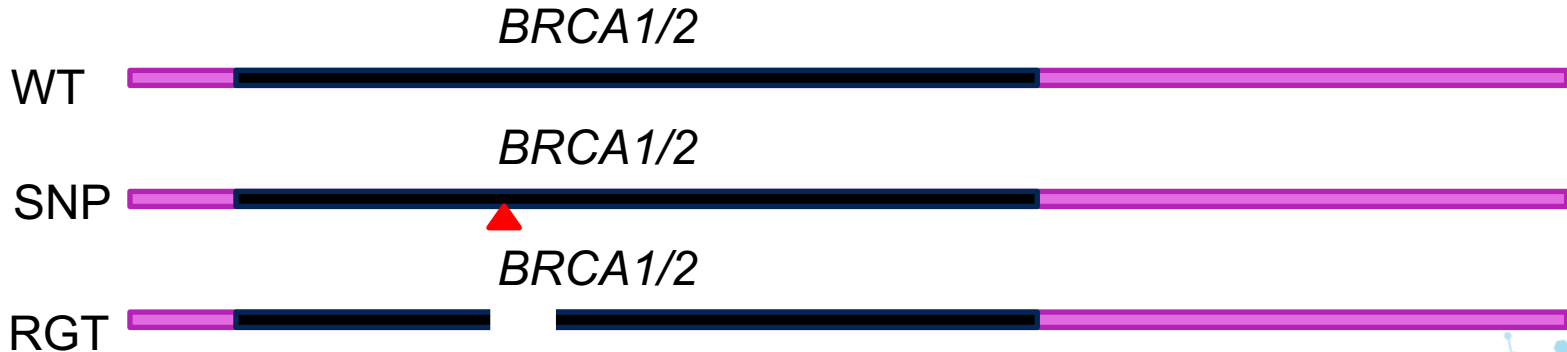
■ Méthodes

- CNV
- Fréquence allélique



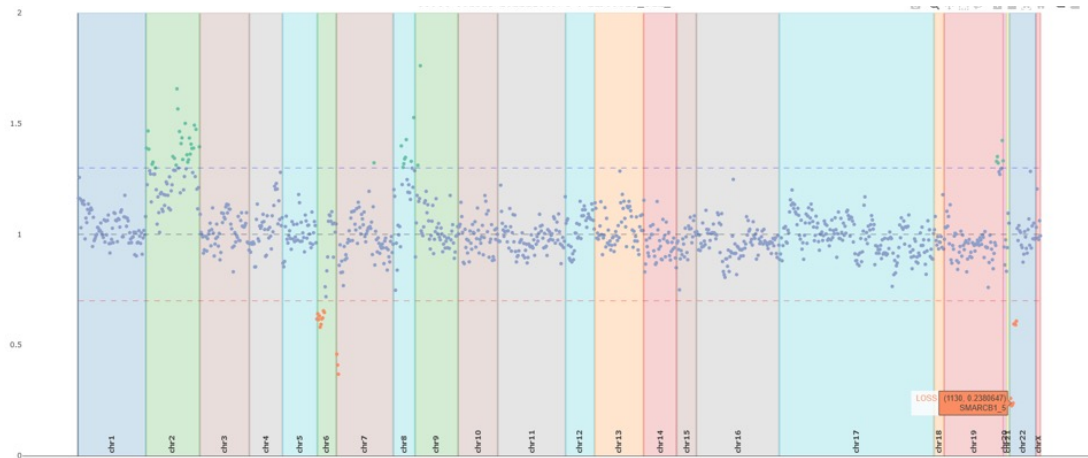
Approche grands réarrangements

- Algorithmes de calcul sur ratio de couverture
- Pas de technique de confirmation pour des seuils < 20 %
- Gènes sensibles – *MSH2* / *BRCA1/APC*



Délétion totale ou focale

- Limitation de la sensibilité
- Distinction entre une délétion totale pour une perte focale
 - Ex. perte *PTEN* – perte *CDKN2A* – perte *SMARCB1*



- Importance d'un « backbone »

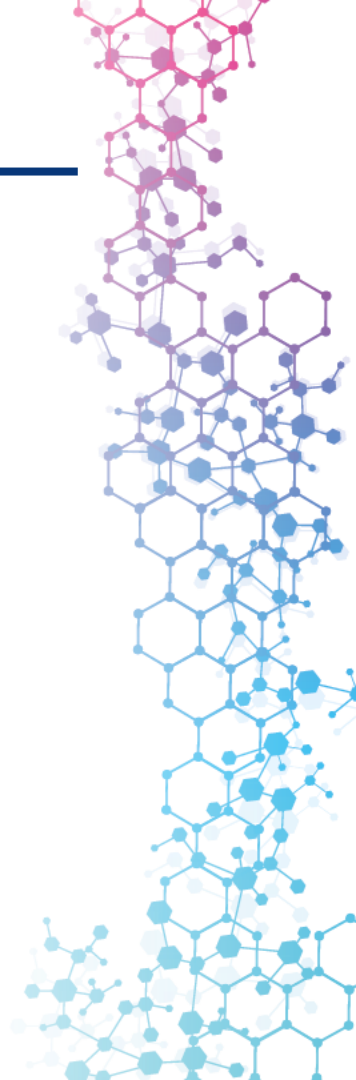


Table 6. Limits of detection of a subset of clinically-actionable alterations in which 940 tests were performed and 46 unique variants were analyzed.

Gene	Alteration Sub-Type	Median LoD
ATM	Indels	0.51% VAF
	ATM-EXPH5 Truncation ^a	1.13% VAF
BRAF	Substitutions	0.33% VAF
BRCA1	Indels	0.38% VAF
	Substitutions	0.34% VAF
	Rearrangement ^a	0.87% VAF
BRCA2	Indels	0.36% VAF
	BRCA2- EDA Truncation ^a	0.48% VAF
	Copy Number Loss	48.1% TF
EGFR	Indels (exon 19 deletions)	0.27% VAF
	Substitutions (L858R substitutions)	0.34% VAF
KRAS	Substitutions	0.33% VAF
MET	Indels	0.41% VAF
NRAS	Substitutions	0.42% VAF
PALB2	Indels	0.37% VAF
	Substitutions	0.51% VAF
PIK3CA	Substitutions	0.34% VAF
ALK	ALK-EML4 Rearrangement	0.24% VAF
	NPM1-ALK Rearrangement	0.94% VAF
NTRK1	NTRK1-TPM3 Rearrangement	0.44% VAF
NTRK3	NTRK3-ETV6 Rearrangement	0.27% VAF
RET	RET-CCDC6 Rearrangement	0.20% VAF
ROS1	ROS1-GOPC Rearrangement	0.75% VAF
	ROS1-SLC34A2 Rearrangement	0.28% VAF
ERBB2	Copy Number Amplification	19.8% TF
PTEN	Copy Number Loss	12.7% TF

TF = tumor fraction; VAF = variant allele fraction.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237802.t006>

Woodhouse, Ryan, Meijuan Li, Jason Hughes, David Delfosse, Joel Skoletsky, Pei Ma, Wei Meng, et al. « Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin ». *PLoS ONE* 15, n° 9 (25 septembre 2020): e0237802.

Insertion Alu

- 0,03–0,1 % des variants pathogènes

- Exemples

- BRCA2 - c.156_157insAlu

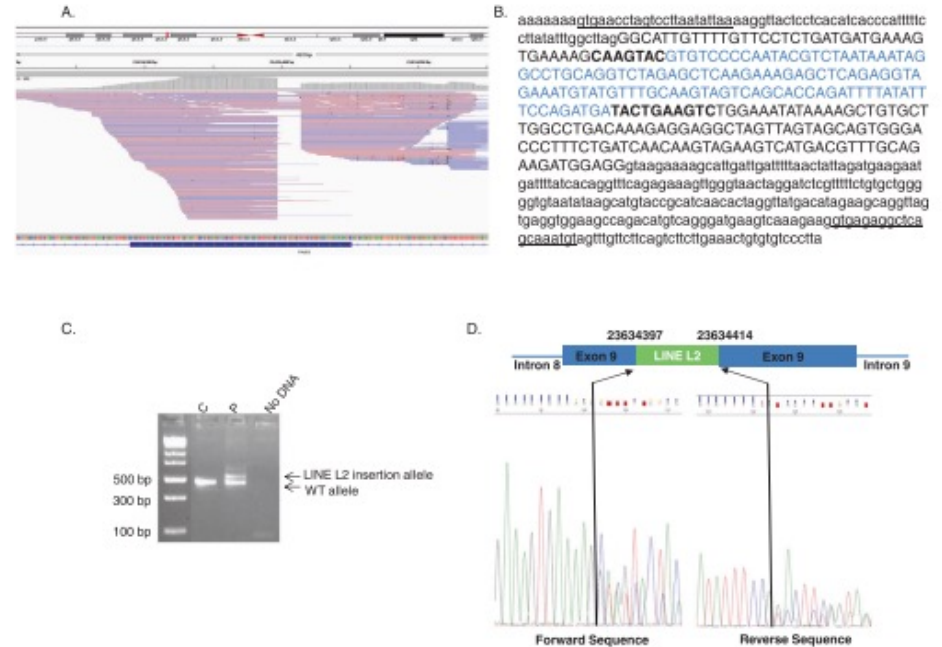
Nord du Portugal 27%

- Exon 8 MSH2

- BRCA1 c.1739_1740insAlu

- PALB2 c.2872_2888delins114AluL2

- Algorithme dédié



De Brakeleer, Sylvia, Jacques De Grève, Willy Lissens, et Erik Teugels. « Systematic Detection of Pathogenic Alu Element Insertions in NGS-Based Diagnostic Screens: The BRCA1/BRCA2 Example ». *Human Mutation* 34, n° 5 (mai 2013): 785-91.

Machado, Patrícia M., Rita D. Brandão, Branca M. Cavaco, Joana Eugénio, Sandra Bento, Mónica Nave, Paula Rodrigues, Aires Fernandes, et Fátima Vaz. « Screening for a BRCA2 Rearrangement in High-Risk Breast/Ovarian Cancer Families: Evidence for a Founder Effect and Analysis of the Associated Phenotypes ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, n° 15 (20 mai 2007): 2027-34.

Baert-Desurmont, Stéphanie, Sophie Coutant, Françoise Charbonnier, Pierre Macquere, François Lecoquierre, Mathias Schwartz, Maud Blanluet, et al. « Optimization of the Diagnosis of Inherited Colorectal Cancer Using NGS and Capture of Exonic and Intronic Sequences of Panel Genes ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 26, n° 11 (novembre 2018): 1597-1602.

Eyries, Mélanie, Olivier Ariste, Gaëlle Legrand, Noémie Basset, Erell Guillerm, Alexandre Perrier, Caroline Duros, Odile Cohen-Haguenaer, Pierre de la Grange, et Florence Coulet. « Detection of a Pathogenic Alu Element Insertion in PALB2 Gene from Targeted NGS Diagnostic Data ». *European Journal of Human Genetics* 30, n° 10 (octobre 2022): 1187-90.

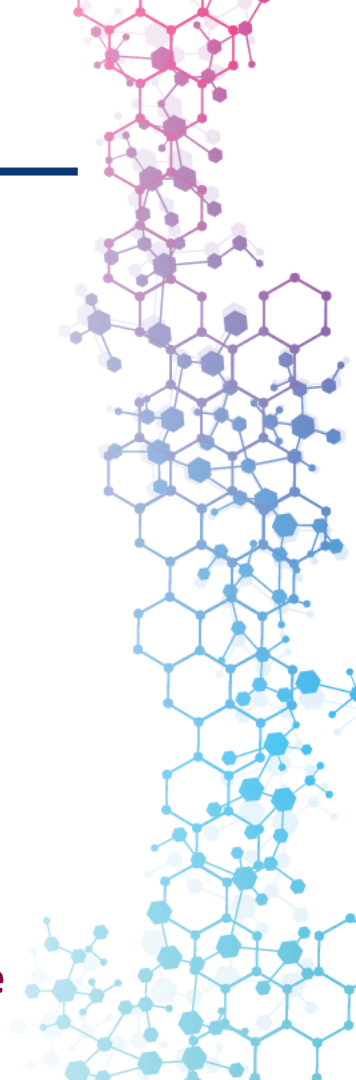
Question

Détection des altérations hors SNV

- Amplification focale
- Délétion focale
- Grand réarrangement
- Séquences Alu

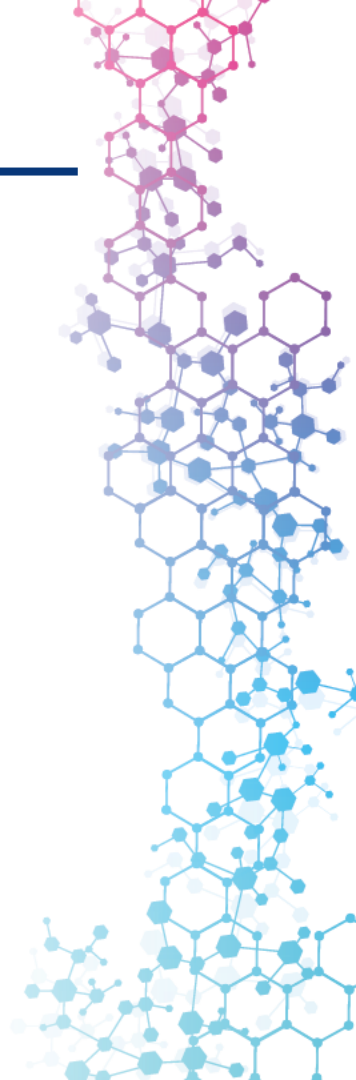
Quelle stratégie pour les altérations hors SNV ?

- 1) Rappel dans le matériel et méthode sur les limites de détection
- 2) Détermination de la LOD
- 3) Phrase type sur un résultat négatif en fonction de la fraction tumorale



Interprétations délicates

- **Artefacts en lien avec l'hypersensibilité**
- **Phénotypes hyper mutés**
- **Hématopoïese clonale**
- **Génétique constitutionnelle**



Phénotypes hypermutés

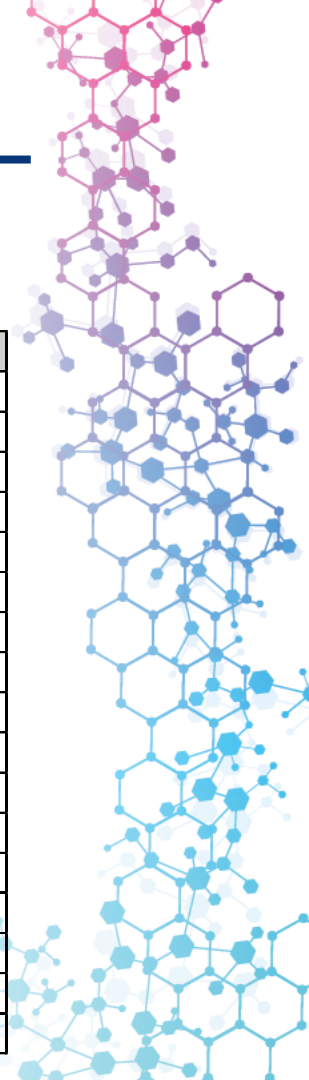
- Impact plus fort des altérations passagers sur les gènes suppresseurs
- Sensibilité d'apparition de variants sur les grands gènes suppresseurs avec l'instabilité des microsatellites

- Exemple

Cancer du pancréas

MSI – TMB 38

Gène	Variant	FA
<i>DNMT3A</i>	c.856-2A>G	1%
<i>STK11</i>	c.863-1G>T	1%
<i>STK11</i>	p.Leu282fs*3	1%
<i>KRAS</i>	p.Gly12Asp	0,62%
<i>PTCH1</i>	c.198+1G>A	0,45%
<i>PTCH1</i>	p.Asn97fs*20	1,20%
<i>PTEN</i>	p.Asn323fs*2	0,76%
<i>PTEN</i>	c.253+2T>C	0,35%
<i>ASXL1</i>	p.Gly645fs*58	1,20%
<i>CREBBP</i>	p.Asn38fs*7	0,55%
<i>CTNNA1</i>	c.301+1G>A	1,70%
<i>DNMT3A</i>	c.856-2A>G	2,50%
<i>JAK1</i>	p.Lys860fs*16	0,73%
<i>MLH1</i>	c.205_207+19delinsC	1,80%
<i>PBRM1</i>	p.Asn258fs*25	1,50%
<i>SMAD4</i>	p.Gly231fs*10	0,88%
<i>SPEN</i>	p.Ile2489fs*9	0,59%



Hétérogénéité de l'ADN circulant

Mosaïque et CHIP

- Interférence avec l'interprétation des alterations sur l'ADN circulant

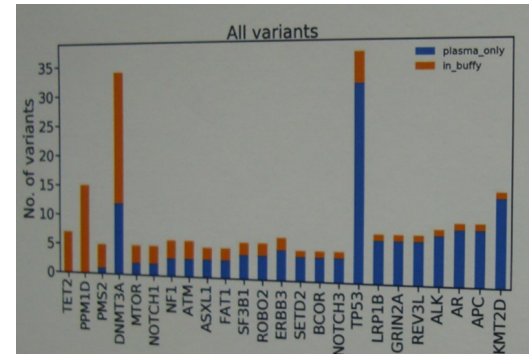
Exemple : PMS2, NF1, ATM, TP53...

- Détection de mosaïques somatiques indépendantes de la tumeur

- Hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé (CHIP) → CHOP

- Acquisition de mutations sur les progéniteurs hématologiques
- Expansion clonale potentielle
- Evaluation des CHIP
 - WBC
 - CD3+ / CD3-

- Gènes spécifiques : *DNMT3A* ou *TET2*



TET2
DNMT3A
PPM1D
CHEK2
ATM

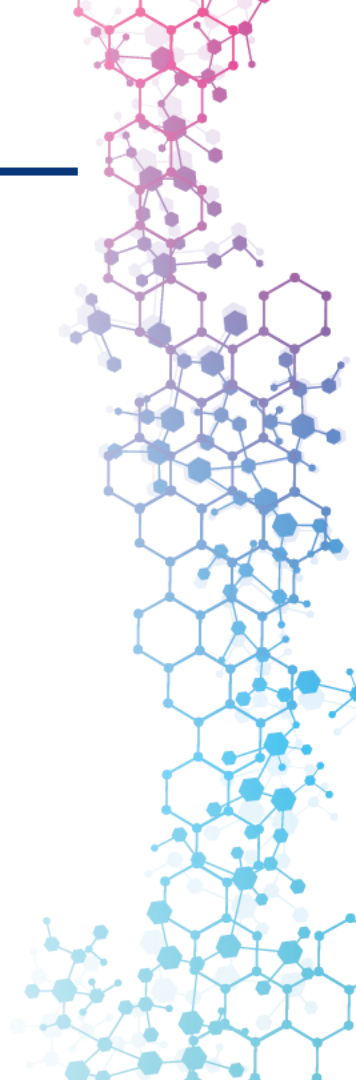
Analysis of clonal hematopoiesis-associated mutations in the cellfree DNA of advanced cancer patients. Jennifer Yen – AACR 2019

Cas clinique

- Patient de 78 ans avec un cancer métastatique de la prostate
- Traitement actuelle: ABIRATERONE
- Traitement antérieur : PARP1 inhibiteur

	Analyse -6m	FA	Analyse actuelle	FA
<i>AR</i>	p.Thr878Ala	0,27%	-	-
<i>BRCA2</i>	p.Trp1563*	0,18%	-	-
<i>BRCA2</i>	p.Pro2107fs*12	3,30%	p.Pro2107fs*12	3,00%
<i>DNMT3A</i>	p.Phe414fs*7	1,40%	-	-
<i>FAS</i>	p.Glu90fs*16	50%		
<i>TET2</i>	p.Asn124fs*1	1,50%		
<i>TMPRSS2-ERG</i>	fusion	0,17%		

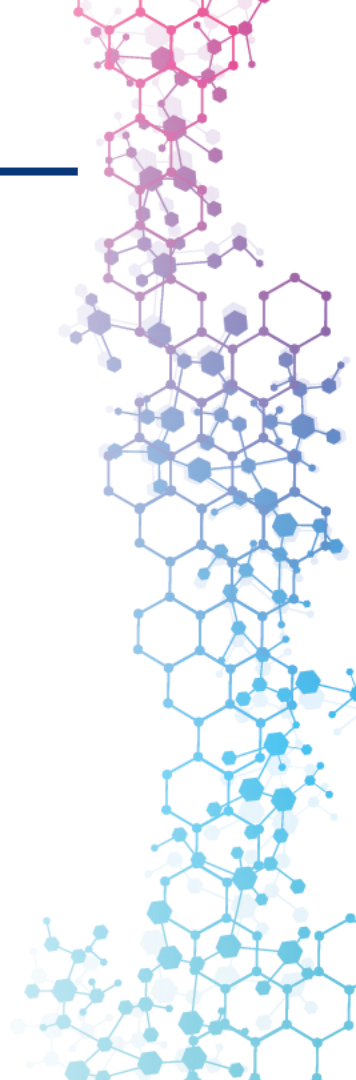
Tableau : analyse à 6 mois (panel 324 gènes) – analyse actuelle (109 gène)



Question

Quelle stratégie pour l'hématopoïese clonale ?

- 1) Vérification systématique sur tissu**
- 2) Orientation des cas suspects en hématologie**
- 3) Suivi**



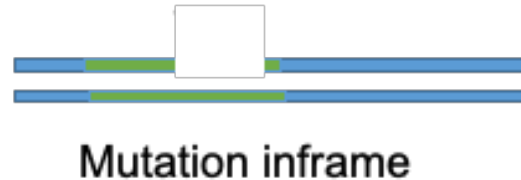
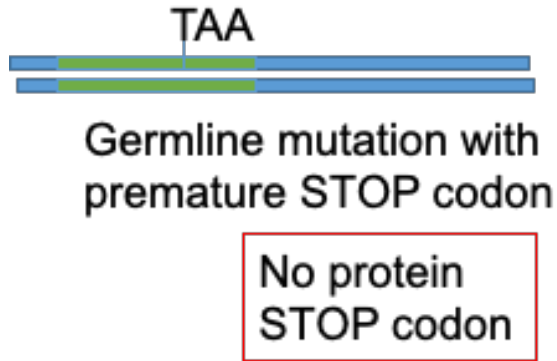
Gènes suppresseurs et résistance

Réversion / résistance en ADN circulant

Risque de retour au BRCA « de type sauvage »

- ❑ Potentiellement après une chimiothérapie à base de platine ou un traitement par inhibiteur de PARP
- ❑ Perte de l'allèle muté
- ❑ Nouvelles mutations et/ou perte de l'allèle muté

Risque théorique sur la tumeur – disparition du variant constitutionnel délétère

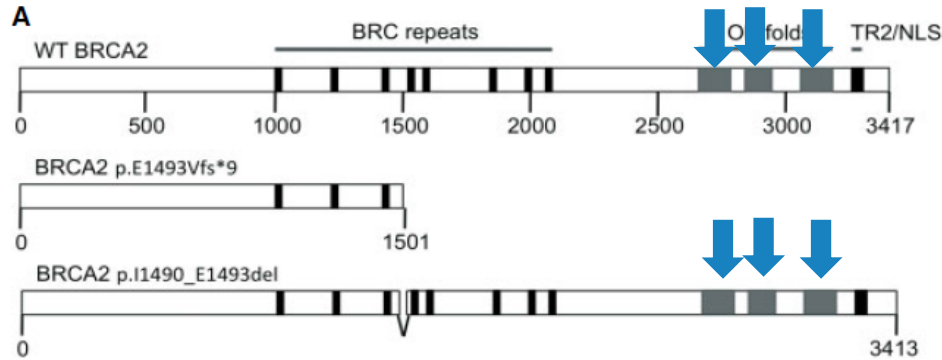


Resistance by
synthetic lethality

Truncated protein
Functionally active

Gènes suppresseurs et résistance

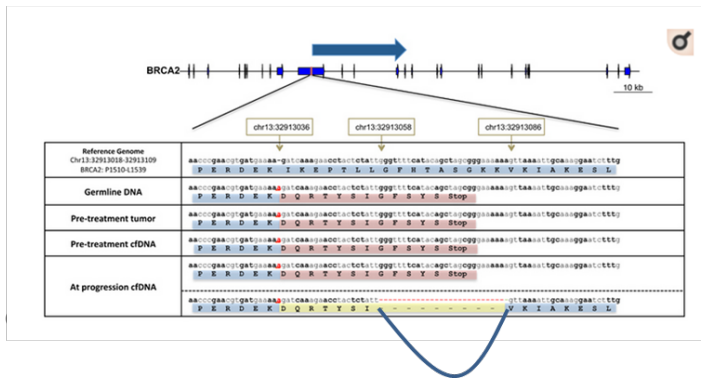
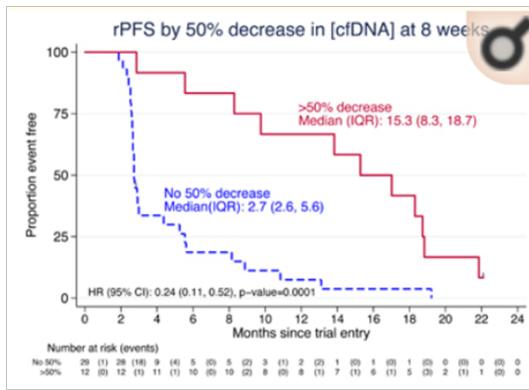
Réversion



Domaines fonctionnels impliqués dans la réparation de l'ADN

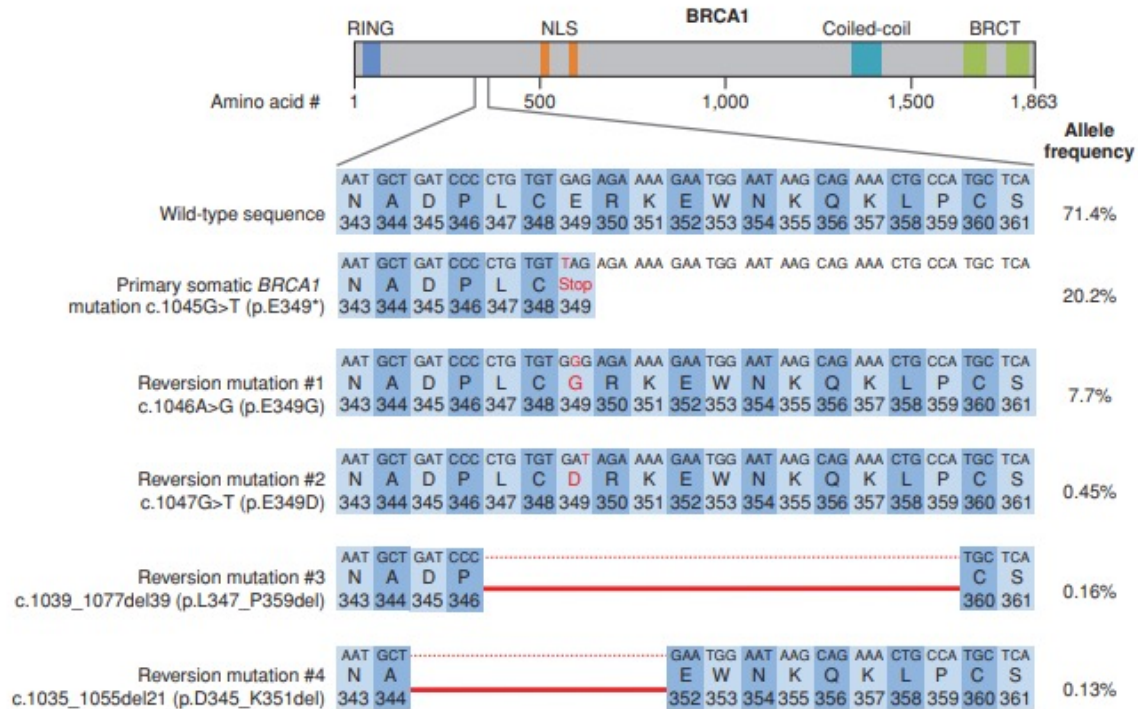
1. Sakai W et al. Nature 2008;451:1116–1120;
2. Edwards SL et al. Nature 2008;451:1111–1115;
3. LJ et al. J Path 2013;229:422–429

Goodall, Jane, Joaquin Mateo, Wei Yuan, Helen Mossop, Nuria Porta, Susana Miranda, Raquel Perez-Lopez, et al. “Circulating Cell-Free DNA to Guide Prostate Cancer Treatment with PARP Inhibition.” *Cancer Discovery* 7, no. 9 (2017): 1006–17.



Gènes suppresseurs et résistance

Réversion - Cancer de l'ovaire



Gènes suppresseurs et résistance

Réversion - Cancer du sein

BRCA1	R1203*	44.5
BRCA1	Q1200 A1206del	0.42
BRCA1	G949 L1216del	0.27
BRCA1	R1203W	12.2
BRCA1	E699 A1279del	0.66
BRCA1	L1198 N1215>	8.6
DNMT3A	Y526fs*1	0.74
EP300	C1QTNF1-EP300 fusion	37.6
TP53	C124fs*1	37,1
TP53	R158C	0,29

TMB = 14

Reversion +++

Gene 1 : BRCA1

ESCAT gene 1 : I

Gene 2 : TMB

ESCAT gene 2 : I

Patiente de 32 ans

Mutation germinale de BRCA1

CARCINOME CANALAIRE INFILTRANT PEU

DIFFERENCIE, TRIPLE NEGATIF, GRADE III, RE-,
RP-, HER2-.

Chimiothérapie néoadjuvante par 4 AC, début
de la chimiothérapie en juillet 2018
puis 7 semaines de CARBOPLATINE + TAXOL

Ligne 1 - Molécule : Carboplatine-Taxol-
Talazoparib

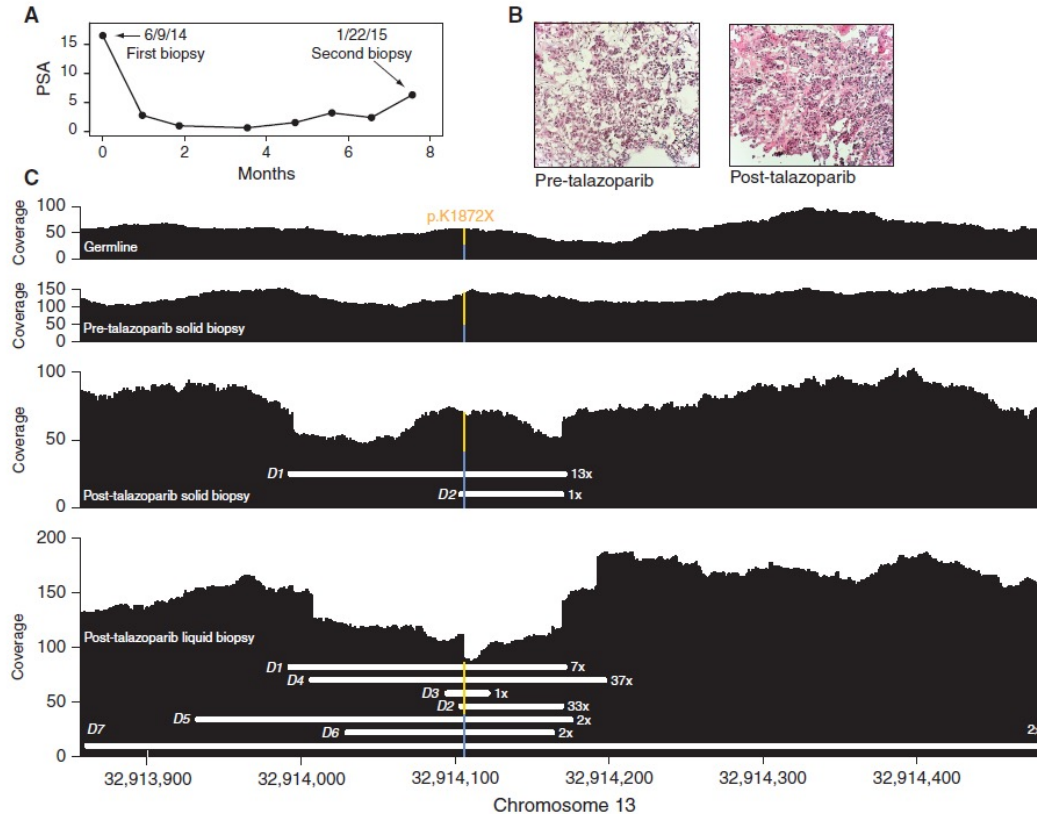
Ligne 2 - Molécule : CAPECITABINE

Ligne 3 - Molécule : Navelbine

Ligne 4 - Molécule : Eribuline

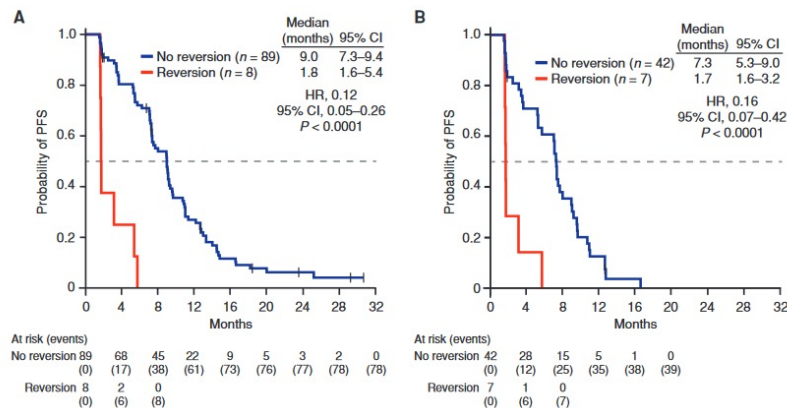
Ligne 5 - Molécule : Sacituzumab Govitecan

Gènes suppresseurs et résistance Réversion - Cancer de la prostate

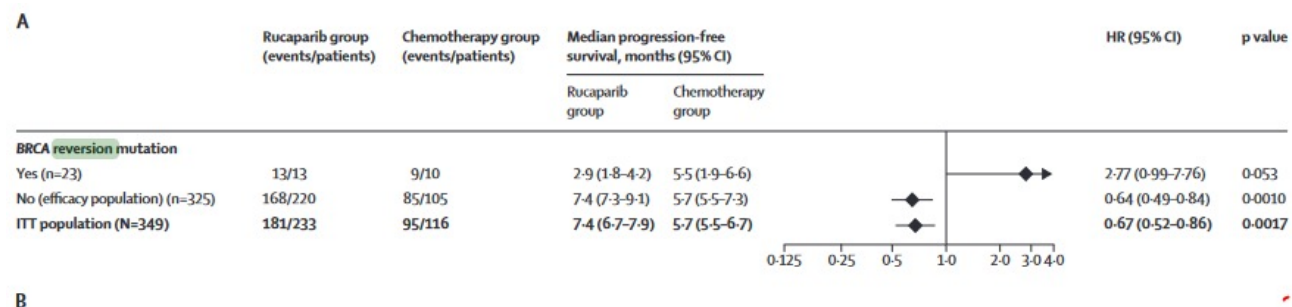


Gènes suppresseurs et résistance

Valeur de l'ADN circulant



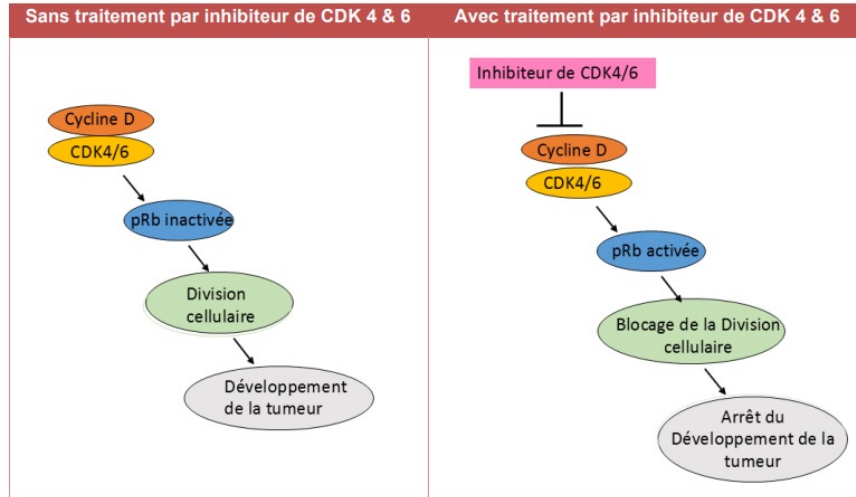
Lin, Kevin K., Maria I. Harrell, Amit M. Oza, Ana Oaknin, Isabelle Ray-Coquard, Anna V. Tinker, Elena Helman, et al. « BRCA Reversion Mutations in Circulating Tumor DNA Predict Primary and Acquired Resistance to the PARP Inhibitor Rucaparib in High-Grade Ovarian Carcinoma ». *Cancer Discovery* 9, n° 2 (8 février 2019): 210-19.



Kristeleit, Rebecca, Alla Lisyanskaya, Alexander Fedenko, Mikhail Dvorkin, Andreia Cristina de Melo, Yaroslav Shparyk, Irina Rakhmatullina, et al. « Rucaparib versus standard-of-care chemotherapy in patients with relapsed ovarian cancer and a deleterious BRCA1 or BRCA2 mutation (ARIEL4): an international, open-label, randomised, phase 3 trial ». *The Lancet Oncology* 23, no 4 (1 avril 2022): 465-78.

Gènes suppresseurs et résistance

Inactivation de résistance



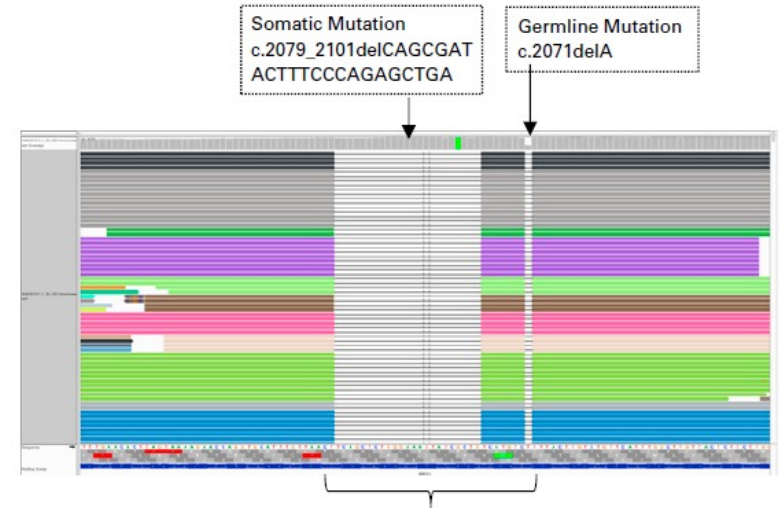
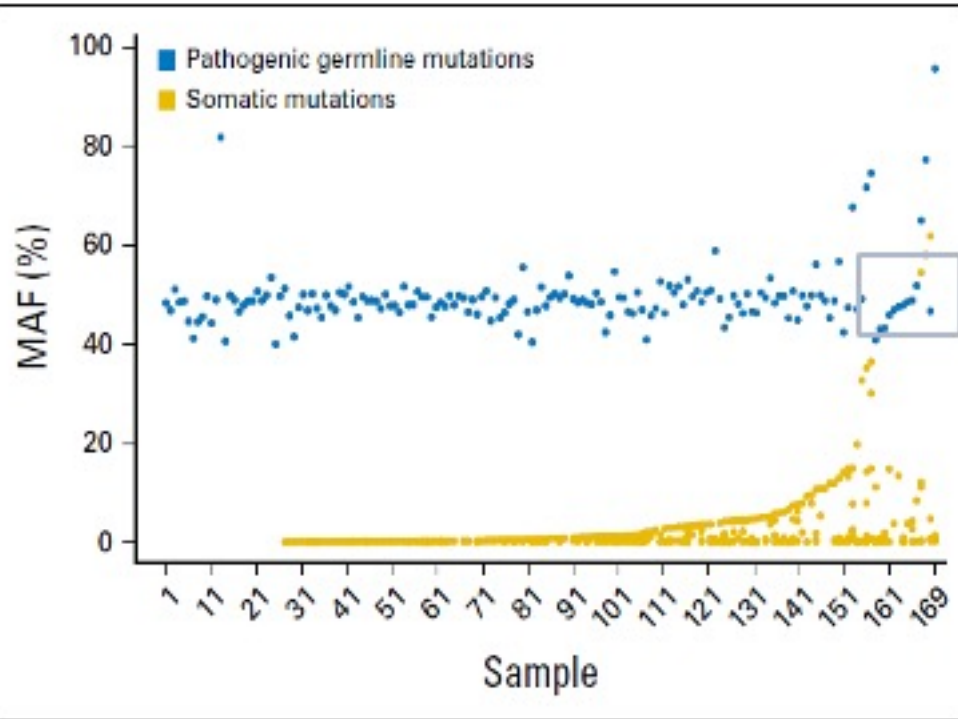
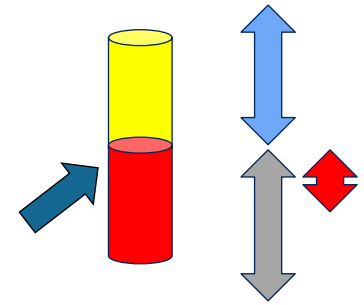
PP-ON-FR-0155 – Avril 2020 © Lilly France – Tout droit réservé

Cancer du sein – traitement antiCDK4/6

PIK3CA	V105_N107>D	54,7
ATM	M1I	0,13
NF1	L2390fs*6	61,3
ARID1A	L2238fs*30	16,5
MAP3K1	F1149fs*23	54,5
MEF2B	E77K	0,49
RB1	Q597fs*10	0,37
RB1	V128fs*8	0,23
RB1	splice site 719-1G>T	29,1
TP53	T140fs*6	49,7
ZNF703	amplification	

Résultat ADN circulant

Gènes suppresseurs et constitutionnel Incidentalome



Taken individually, each mutation results in a frameshift (loss of function). Combined, the net result is a 24-nucleotide deletion that puts *BRCA1* back in frame (ie, reverts to pseudo-wild type).

Slavin, Thomas P., Kimberly C. Banks, Darya Chudova, Geoffrey R. Oxnard, Justin I. Odegaard, Rebecca J. Nagy, Kar Wing Kevin Tsang, et al. « Identification of Incidental Germline Mutations in Patients With Advanced Solid Tumors Who Underwent Cell-Free Circulating Tumor DNA Sequencing ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19 octobre 2018, JCO1800328.

Gènes suppresseurs et constitutionnel

Incidentalome

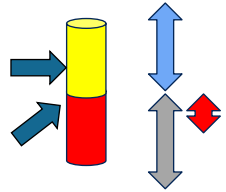
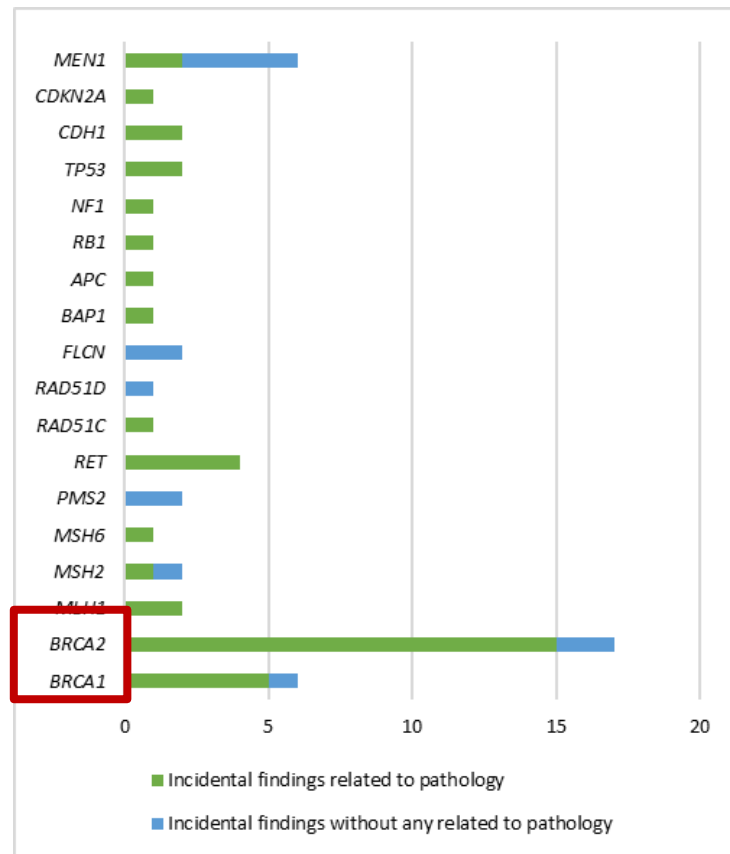
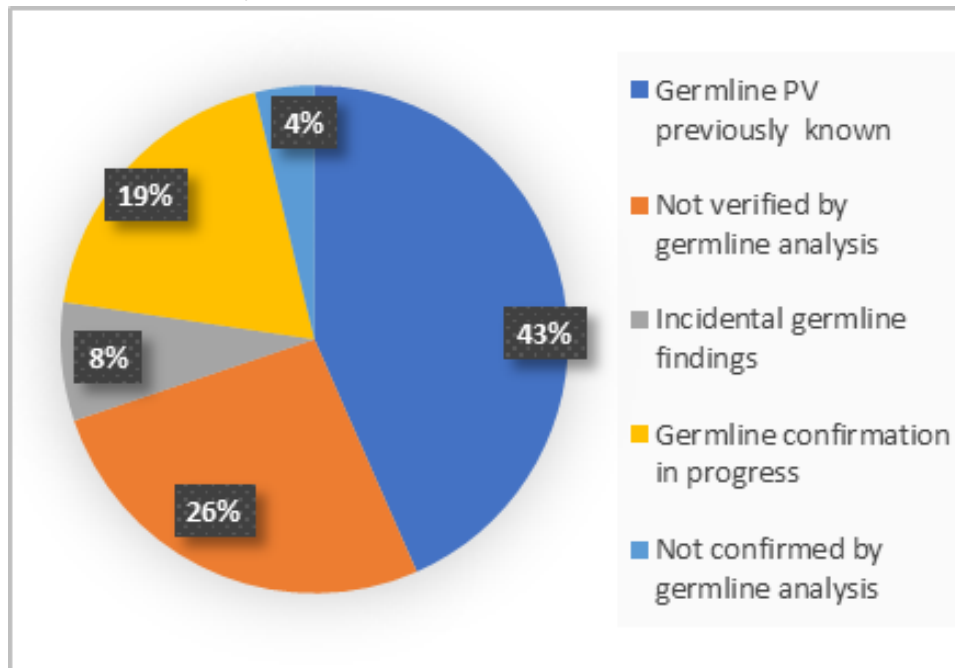


Table 1. Putative Germline Mutation Occurrences by Cancer Type

Patient Characteristic	Cancer Type, No. (%)							
	All	Ovarian	Prostate	Pancreatic	Breast	Lung	Colorectal*	Other†
No. of patients	10,888	210	617	332	2,064	4,459	878	2,328
Sex								
Female	6,242 (57.3)	210 (100)	0 (0)	143 (43.1)	2,037 (98.7)	2,449 (54.9)	397 (45.2)	1,006 (43.2)
Male	4,646 (42.7)	0 (0)	617 (100)	189 (56.9)	27 (1.3)	2010 (45.1)	481 (54.8)	1,322 (56.8)
Mean age, years (range)	63.6 (18-95)	62.3 (25-89)	68.7 (35-89)	64.5 (34-89)	58.6 (25-95)	66.4 (20-89)	59.5 (21-89)	62.4 (18-89)
Patients with putative germline mutation	156 (1.4)	17 (8.1)	21 (3.4)	11 (3.3)	45 (2.2)	33 (0.7)	5 (0.6)	24 (1)
Gene								
<i>BRCA2</i>	81	3	20	7	27	17	1	6
<i>BRCA1</i>	41	14		1	10	11	1	4
<i>CDKN2A</i>	10			1	3	2		4
<i>ATM</i>	5			1	2	2		
<i>TP53</i>	5				3			2
<i>APC</i>	4						1	3
<i>NF1</i>	4		1			1		2
<i>RB1</i>	2							2
<i>RET</i>	2			1				1
<i>MLH1</i>	1						1	
<i>SMAD4</i>	1						1	

Slavin, Thomas P., Kimberly C. Banks, Darya Chudova, Geoffrey R. Oxnard, Justin I. Odegaard, Rebecca J. Nagy, Kar Wing Kevin Tsang, et al. « Identification of Incidental Germline Mutations in Patients With Advanced Solid Tumors Who Underwent Cell-Free Circulating Tumor DNA Sequencing ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19 octobre 2018, JCO1800328.

#28493 - SS087 Implication de la biopsie liquide dans la découverte incidente d'anomalie constitutionnelle associée à la prédisposition au cancer Alice CHABERT (Villejuif), Hela SASSI, Damien VASSEUR, Nathalie AUGER, Ludovic LACROIX, Olivier CARON, Veronica GOLDBARG, Antoine ITALIANO, Etienne ROULEAU



- 57% non connus avant l'analyse FMI
- Pour 13 patients (1,6%): pas de lien entre cancer traité et variant potentiellement germlinal retrouvé

Gènes suppresseurs et constitutionnel

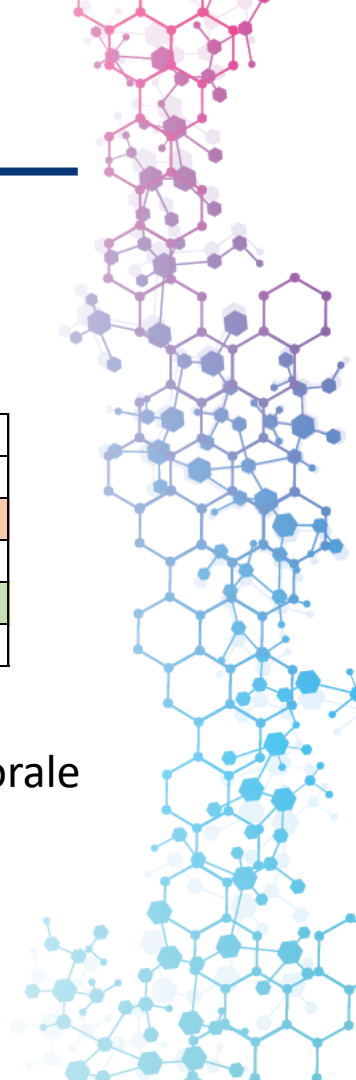
Incidentalome - colorectal

Deux situations

KRAS	Q61H	7,6
MUTYH	G382D	48,9
SMAD2	S464*	14,1
APC	Q1429*	10
TBX3	F325fs*36	6,1
PIK3R1	deletion exons 13-16	4,2
TP53	L289P	0,93
CASP8	R230*	0,75
TP53	E258D	0,46
TP53	F113V	0,27

KRAS	G12C	19.6%
APC	R1336fs*8	39.4%
CDKN2A/B	p16INK4a D108N and p	0.56%
CTCF	T204fs*26	18.4%
MUTYH	G382D	100.0%
TP53	G245D	25.2%

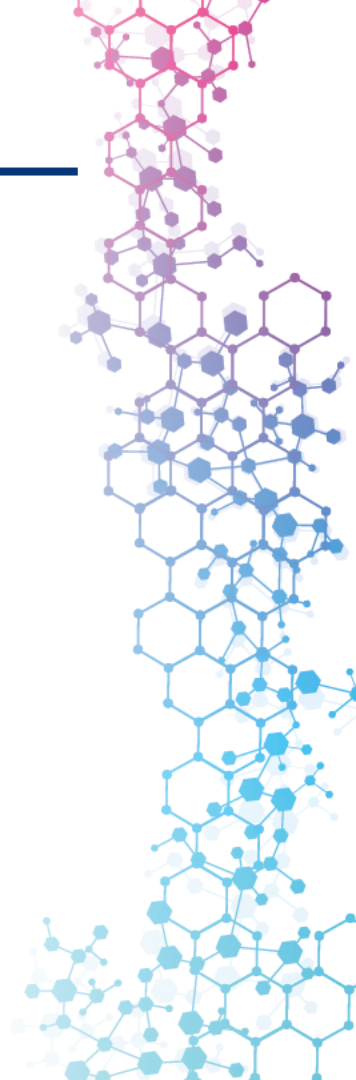
=> inhibiteur KRAS G12C
Arrêt pour progression tumorale



Question

Quelle stratégie pour l'incidentalome ?

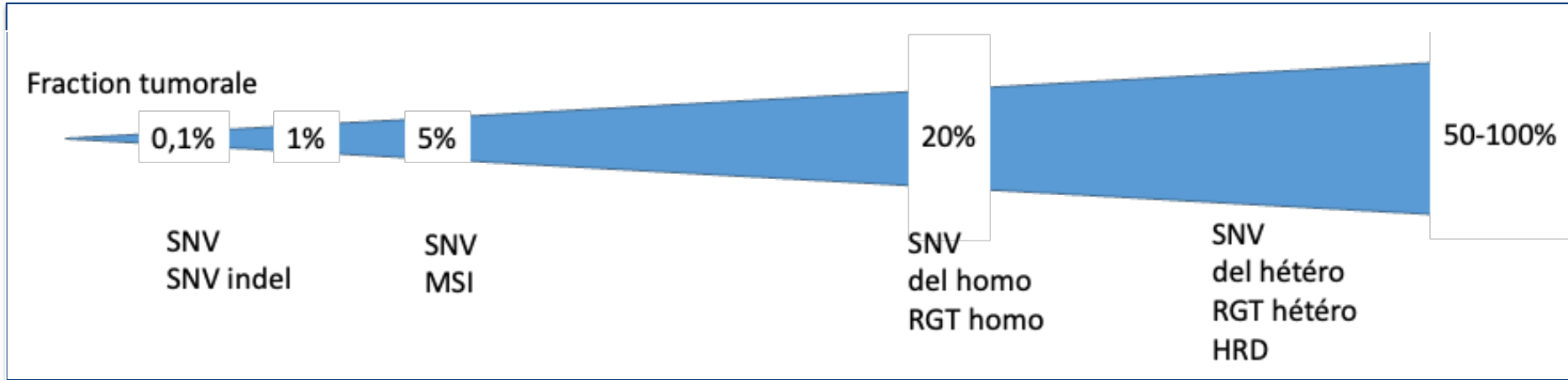
- 1) Mise en place d'une note d'information
- 2) Orientation vers une consultation d'oncogénétique systématique
- 3) Orientation en fonction de la fréquence allélique
- 4) Mise en place d'une liste de gènes



Fraction tumorale et signal

Approche des signatures

- **Limitation signal suffisamment important**
 - MSI
 - HRD
- **Importance de la quantité d'ADN circulant initial +++**

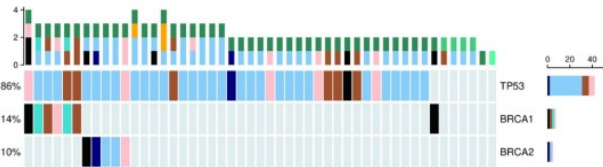
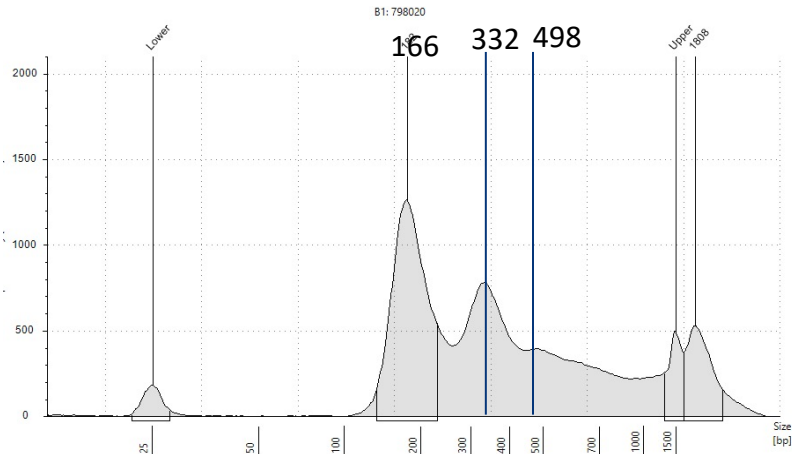


Fraction tumorale et signal

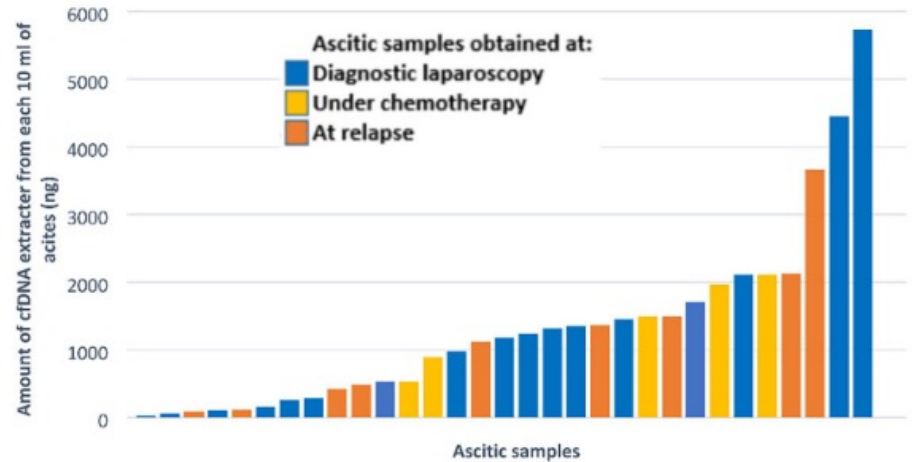
Autres liquides - ascite

■ Application - cancer de l'ovaire sévère de haut grade

- recherche des variants TP53 / BRCA1/BRCA2
- Extraction du **liquide acellulaire**



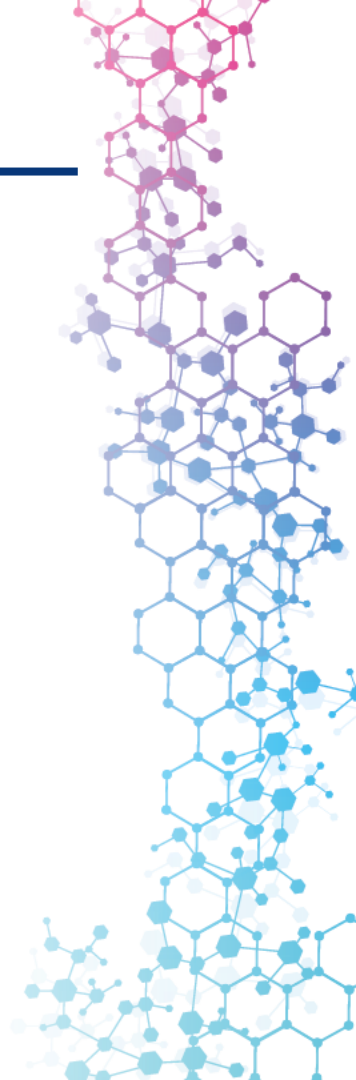
Roussel-Simonin, Cyril, Felix Blanc-Durand, Roseline Tang, Damien Vasseur, Audrey Le Formal, Laure Chardin, Elisa Yaniz, et al. « Homologous recombination deficiency (HRD) testing on cell-free tumor DNA from peritoneal fluid ». *Molecular Cancer* 22, n° 1 (6 novembre 2023): 178



Kfoury, Maria, Reda El Hazzaz, Claire Sanson, Felix Blanc Durand, Judith Michels, Emeline Colomba Blameble, Roseline Tang, et al. « Circulating Tumor DNA from Ascites as an alternative to tumor sampling for genomic profiling in ovarian cancer patients ». *Biomarker Research* 11, n° 1 (20 octobre 2023): 93.

Conclusion

- **De plus en plus de demandes pour des gènes suppresseurs sur les panels**
- **Des applications sur l'ADN circulants**
- **Plus d'exigence technique et impact direct sur le coût**
- **Augmentation des risques d'erreur**
 - Faux négatifs – altérations non couvertes
 - Faux négatifs – altérations du nombre de copies/RGT/altération rares
 - Faux positifs – artefacts techniques
 - Faux positifs – hématoïèse clonale
 - Vrais positifs mais sans signification clinique – hyper mutations
- **Risque d'incidentalome augmenté**



MERCI DE VOTRE ATTENTION

