

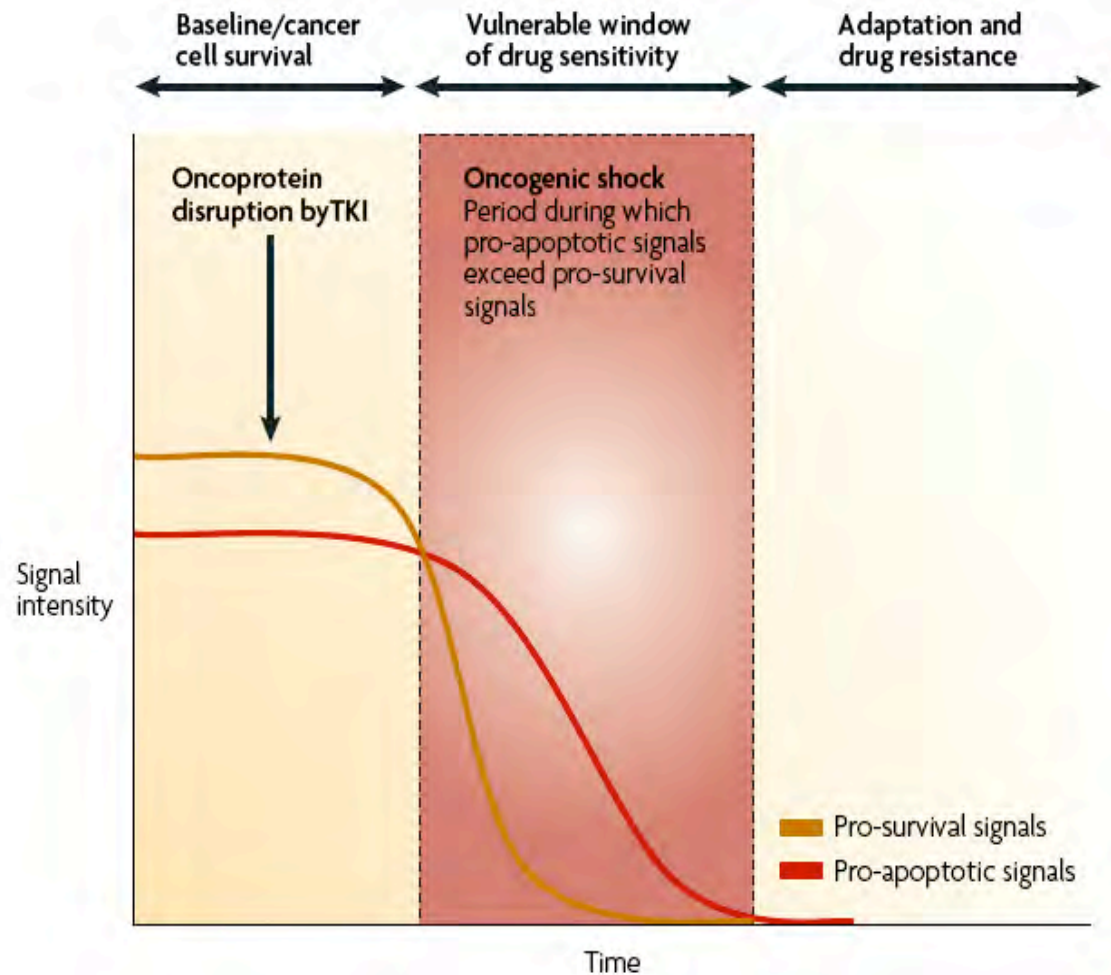
Les addictions oncogéniques: du diagnostic au suivi

Michèle Beau-Faller

Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire
Plate-forme de Génomique Moléculaire des Cancers d'Alsace (PGMCA)
Unité INSERM U1113, groupe « Stress cellulaire et innovations thérapeutiques »
CHU Strasbourg

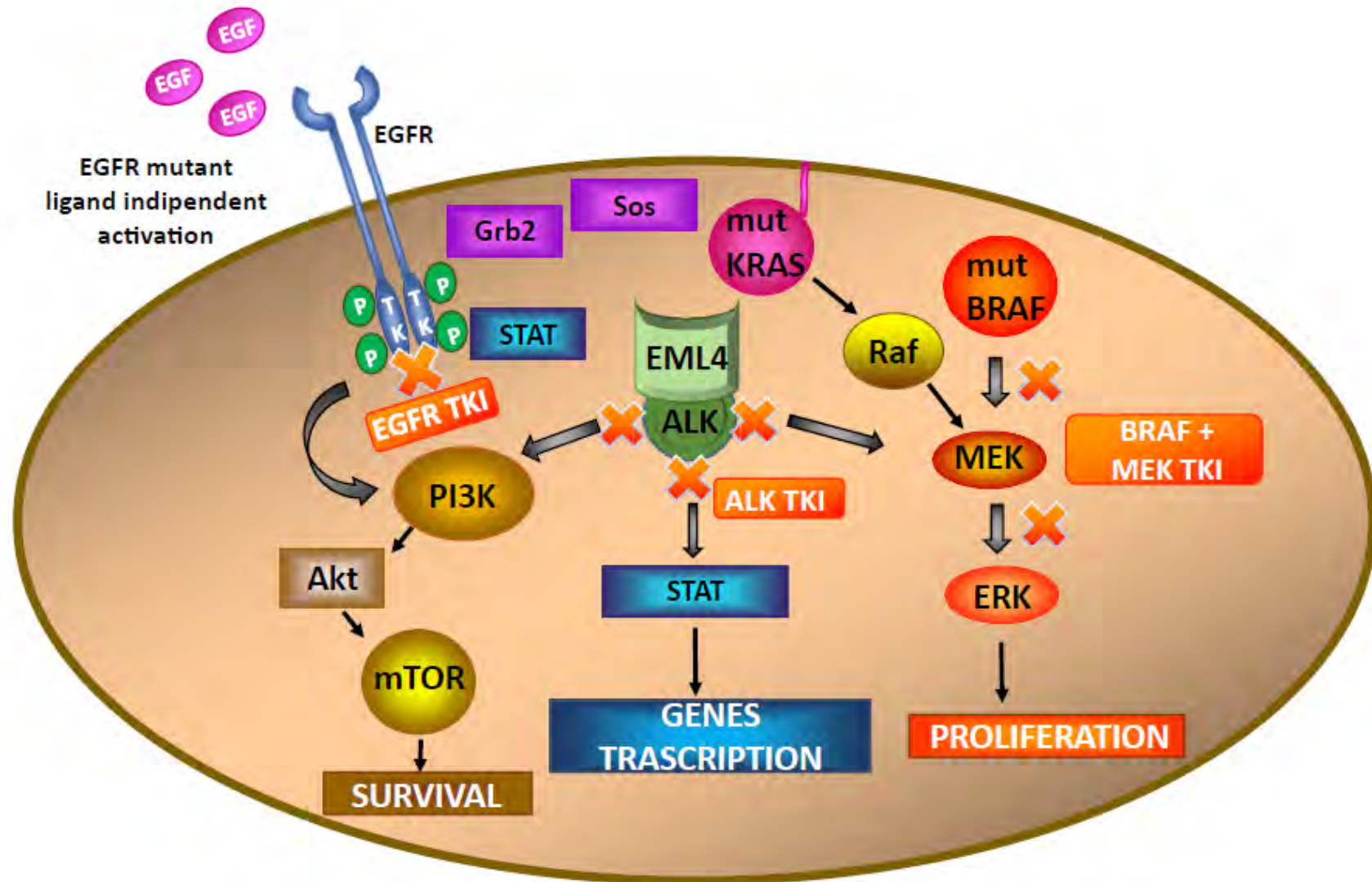


L'addiction oncogénique



- L'identification d'un driver oncogénique fait partie des éléments décisionnels, en plus du stade, du type histologique, du PS, des co-morbidités

Du diagnostic ... au suivi



Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



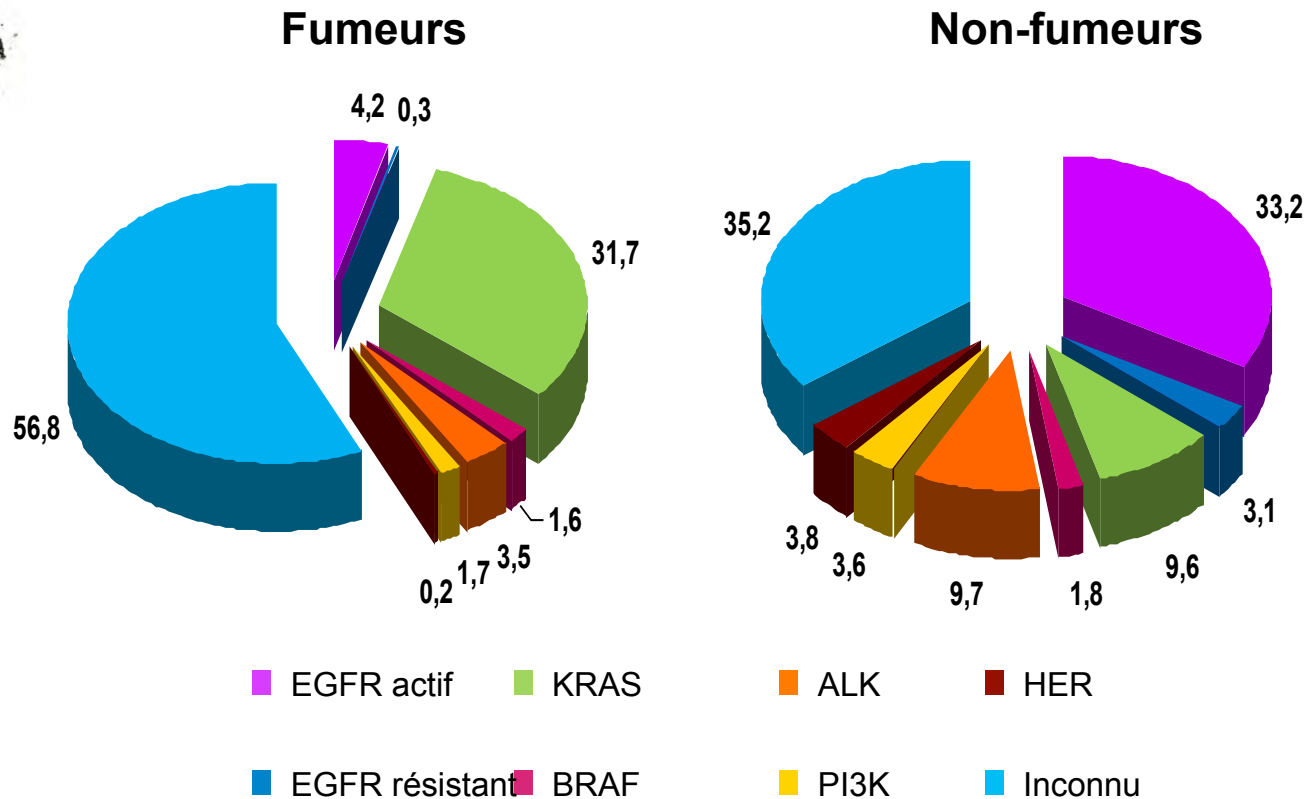
Figure 1. Situation des 28 plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers



Étude BIOMARQUEURS France



BIOMARQUEURS en fonction du tabagisme (n = 9 911*)



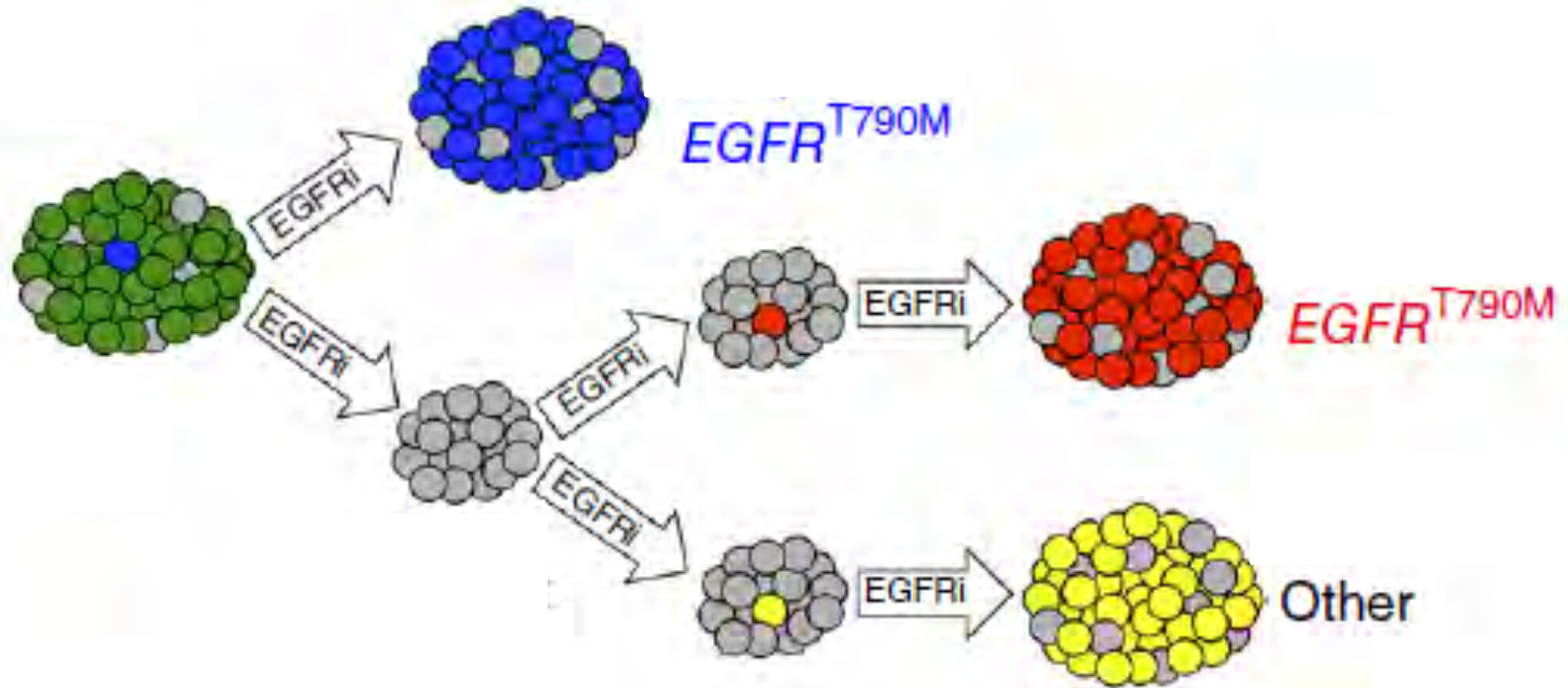
* Incluant les 2 664 cas avec données cliniques totalement disponibles au moment de l'analyse.

Du diagnostic ... au suivi

Au diagnostic

Suivi-1

Suivi-2



Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
cMET Δ 14, HER2,, KRAS

Recherche de translocations
ALK, ROS1
RET, NRG1, NTRK

A la progression

ITK EGFR 1^{ère}/2^{ème} génération

ITK ALK 1^{ère}/2^{ème}/3^{ème} génération

A la progression

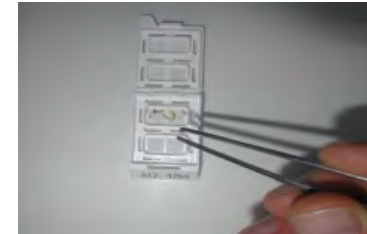
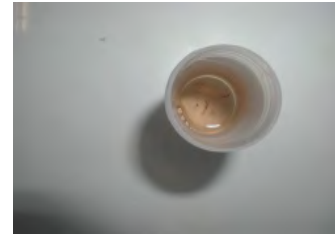
ITK EGFR 3^{ème} génération

Les prélèvements

Tissus tumoraux

- Biopsies

- Quantité
 - Diagnostic histologique minimal
 - Réaliser d'emblée les lames blanches
 - Garder un back-up
- Qualité
 - Type de fixateur
 - Durée de fixation
- Cellularité tumorale
- Re-biopsies



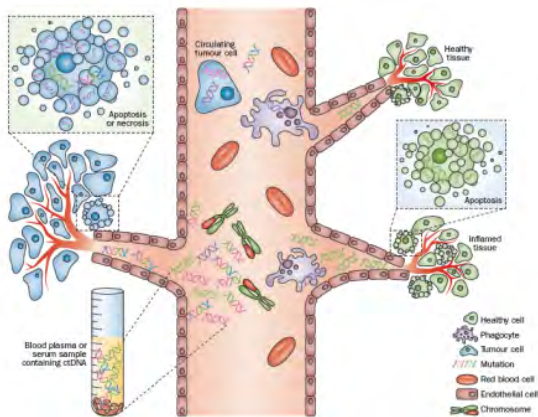
- Cytologies



- Liquide pleural, lavage bronchique/LBA, liquide céphalo-rachidien, liquide EBUS
- Surnageants de liquides

Les prélèvements

Biopsies liquides

- Cellules Tumoraes Circulantes ou ADN tumoral circulant



Type d'analyse	Avantages	Inconvénients
CTC 	Visualisation directe du phénotype malin Immunocytochimie FISH	Quantité très faible Fragilité des cellules Sensibilité < 40% Faux négatifs
ADNtc 	Sensibilité 36-100% Analyse des mutations Monitoring moléculaire	Pré-analytique Hétérogénéité Recherche des translocations non validée Faux négatifs

- ADNtc : Importance du pré-analytique

- Quantité: au moins 4ml de plasma final
- Qualité



- Tubes EDTA < 4 heures
- Tubes DNA BCT[®] (Streck), cell-free DNA collection tubes[®] (Roche), PAXgene Blood cfDNA Tube[®] (Qiagen)



- Double centrifugation

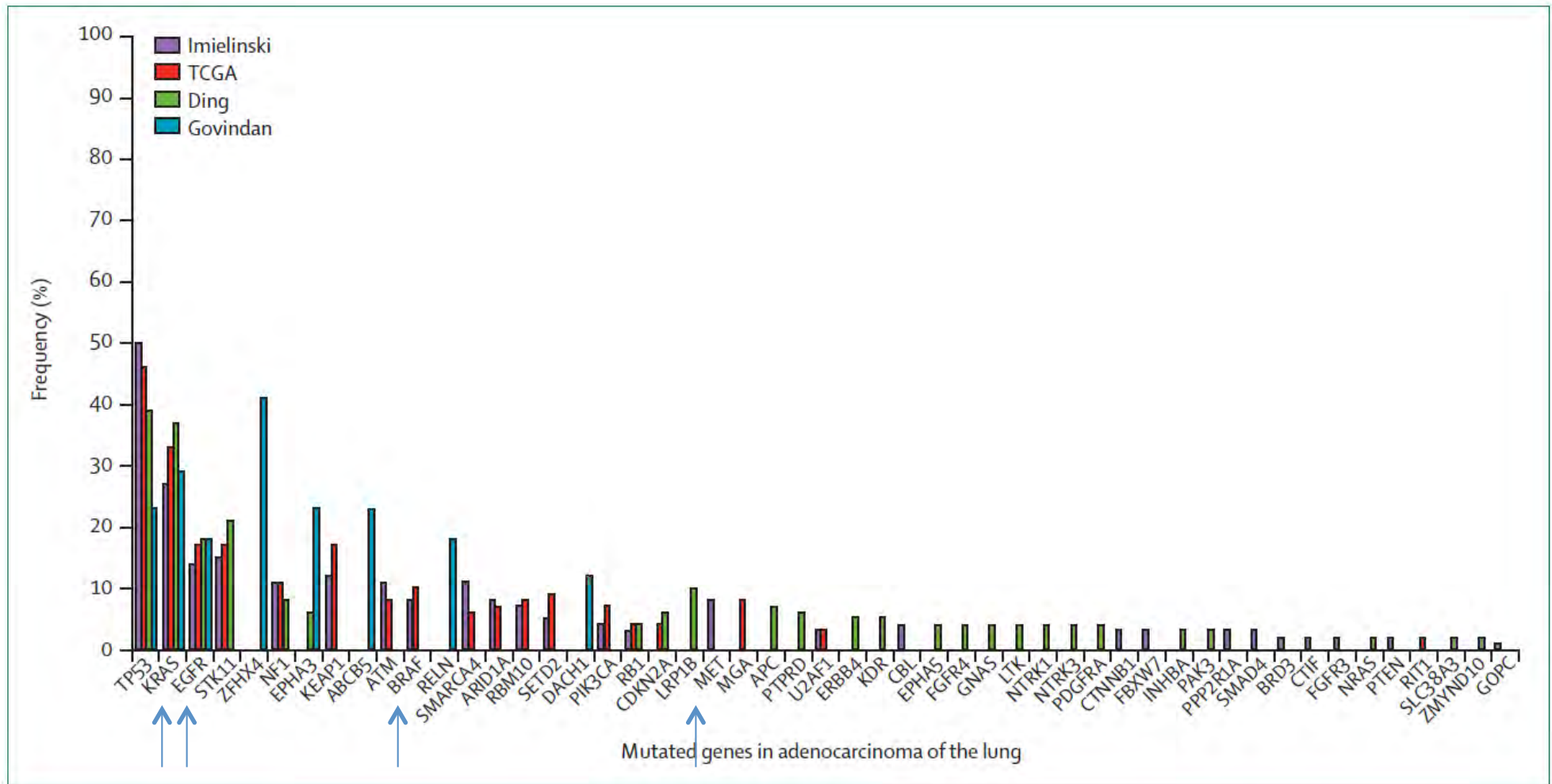
Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



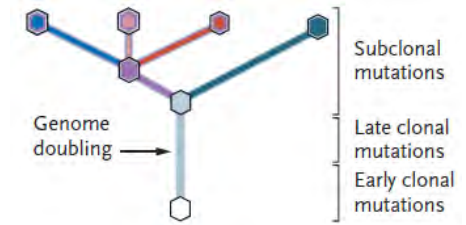
Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
cMET Δ 14, HER2,, KRAS

Les mutations



Les mutations



- Driver : directement liées à l'activation d'une voie de signalisation dont la cellule dépend pour sa survie
- « Passagères »:
 - soit modulateurs non essentiels du processus tumoral
 - soit conséquences de l'instabilité génétique, sans impact fonctionnel
- Les polymorphismes (SNP, Single Nucleotide Polymorphism): *modifications présentes chez un grand nombre d'individus normaux*

Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique

Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
cMET Δ 14, HER2,, KRAS

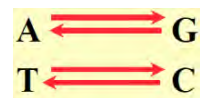
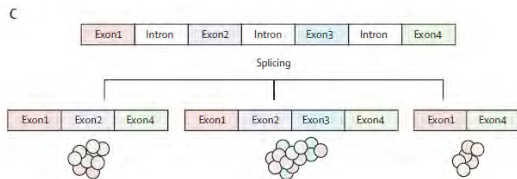
- Non muté/wild type
- Les types de mutations
- Les compte-rendus

	Faux-sens	Non-sens	
Effect of mutation	Normal	Missense	Non-sense
DNA	TTC	TCC	ATC
mRNA	AAG	AGG	UAG
Amino acid	Lysine	Arginine	STOP

UAA, UAG, UGA

Truncating mutation

Mutation de site d'épissage
exon skipping



transition
KRAS, TP53,
LKB1, NF1



transversion
EGFR, RB1,
PI3KCA, ERBB2

S R L S R
AGC AGA CTT AGC CGA
AGC **ATG** ACT TAG CCG
S **M** **T** stop

Frameshift mutation

non x3

N I I F G V
AAT ATC ATC **TTT** GGT GTT
AAT ATC ATT GGT GTT TCC
N I I G V S

Indel, inframe mutation

x3

Les oncogènes drivers

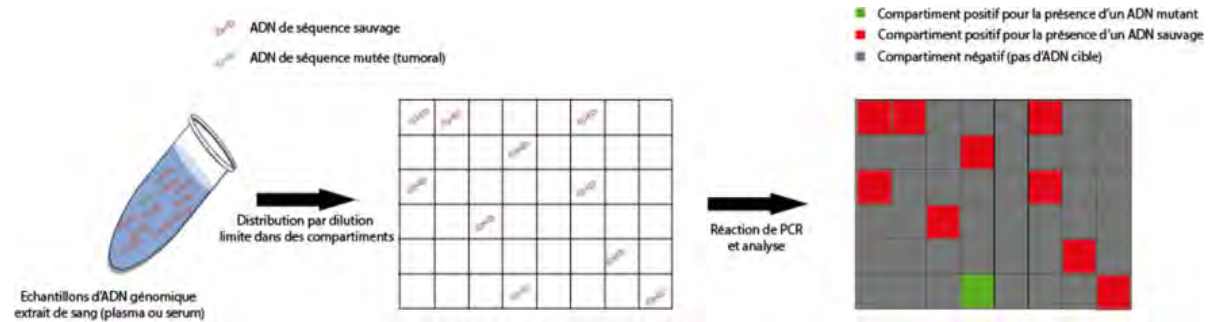
les mutations

- Sanger
- Techniques ciblées

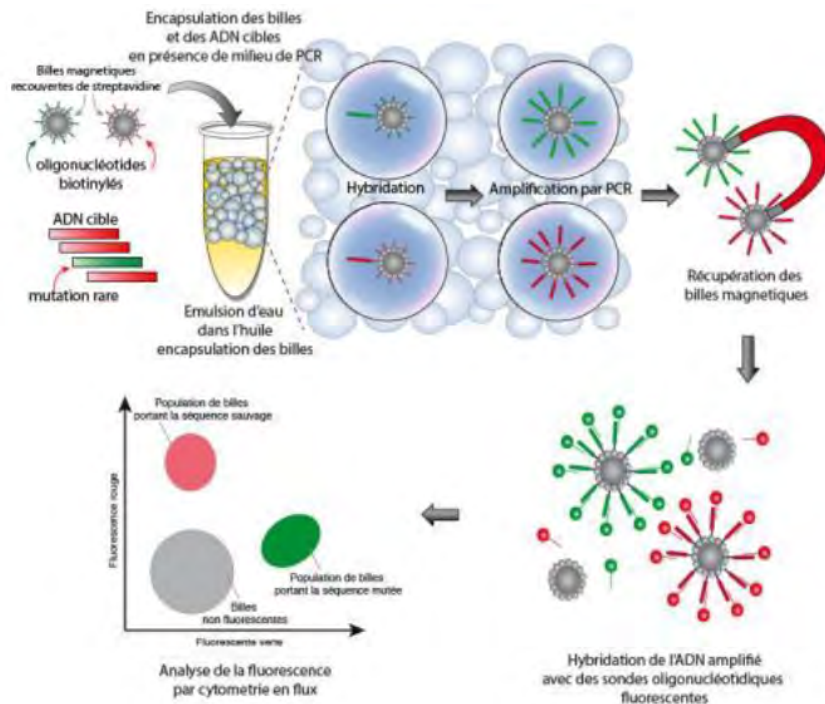
	Techniques	Advantage	Disadvantage
Sanger	« Gold standard »	Complete	Bad sensitivity (20%) Time consuming « Cost » if lot of exons
Techniques sans a priori	HRM	Complete	Sensitivity
Techniques avec a priori = Techniques ciblées	Pyrosequencing Allele-specific amplification Snap-shot Fragment analysis	Quickly Best sensitivity	No complete Cost

Les oncogènes drivers *les mutations*

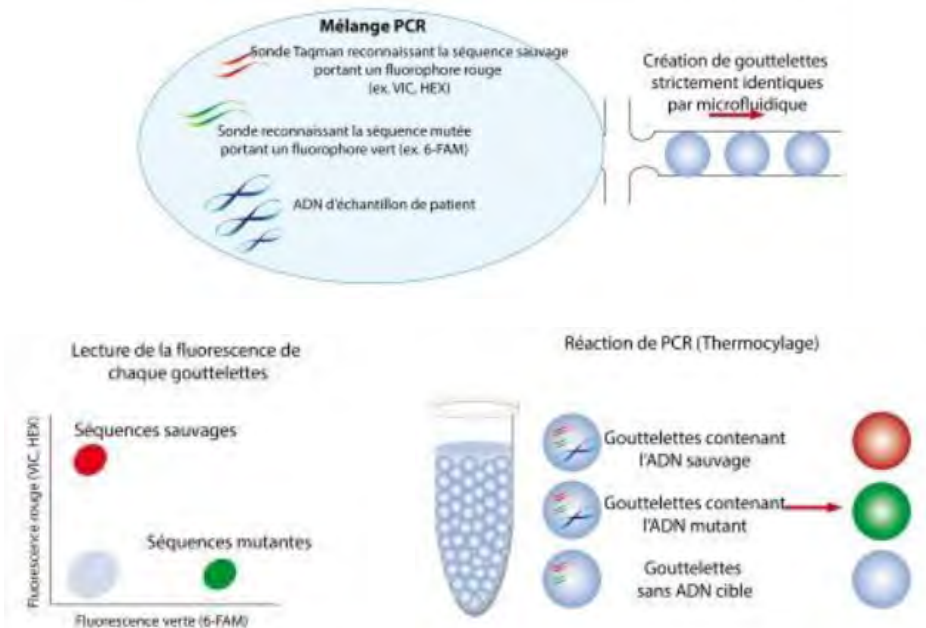
- La PCR digitale



PCR digitale par BEAMing (Billes, émulsion, amplification et magnétique)

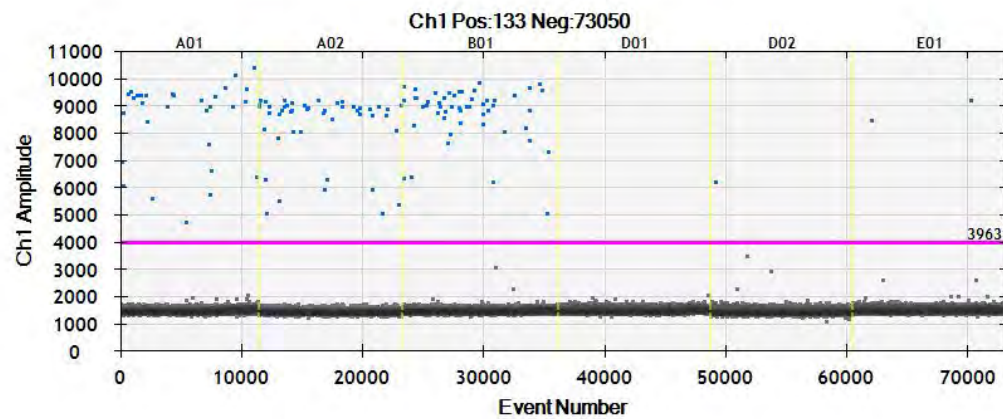


PCR digitale en microfluidique de gouttes (droplet DPCR, ddPCR)

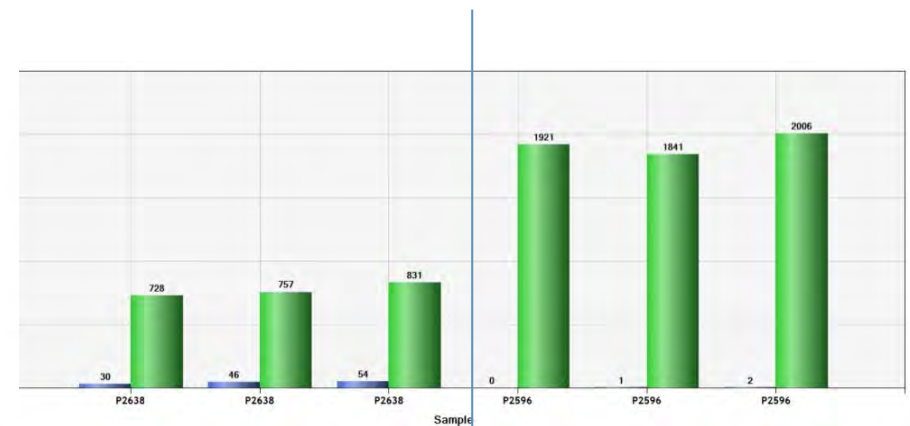


Les oncogènes drivers *les mutations*

- La PCR digitale
- Mutations



➤ Abondance fractionnelle:



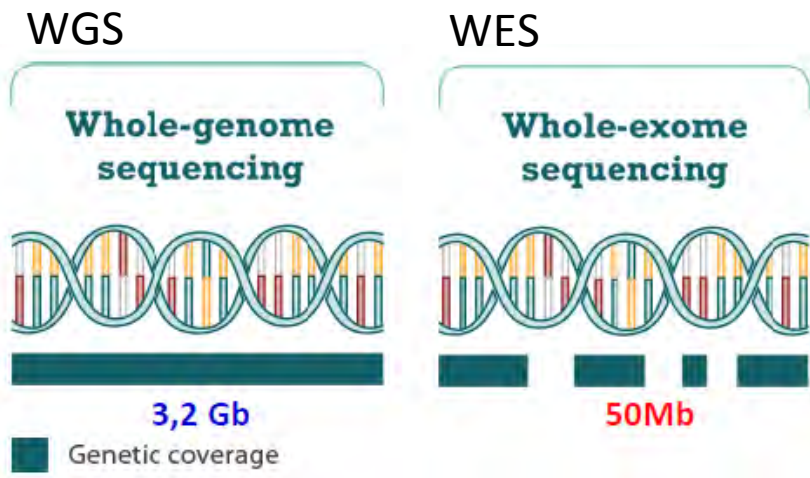
5%

0,05%

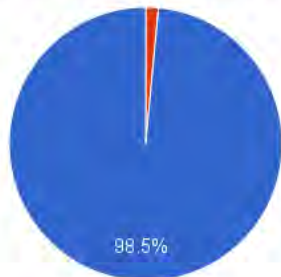
- Amplifications

Les oncogènes drivers *les mutations*

- Le NGS -ciblé



Exome and Genome



- Exome
- Genome

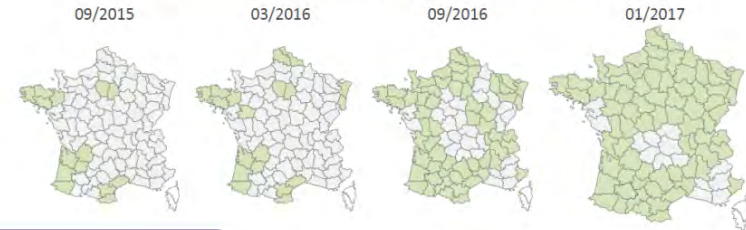
Genome is full code (Exome + junk + other etc)

Exome is the coding part (about 1.5% of the Genome)

DÉPLOIEMENT DU NGS EN GÉNÉTIQUE TUMORALE

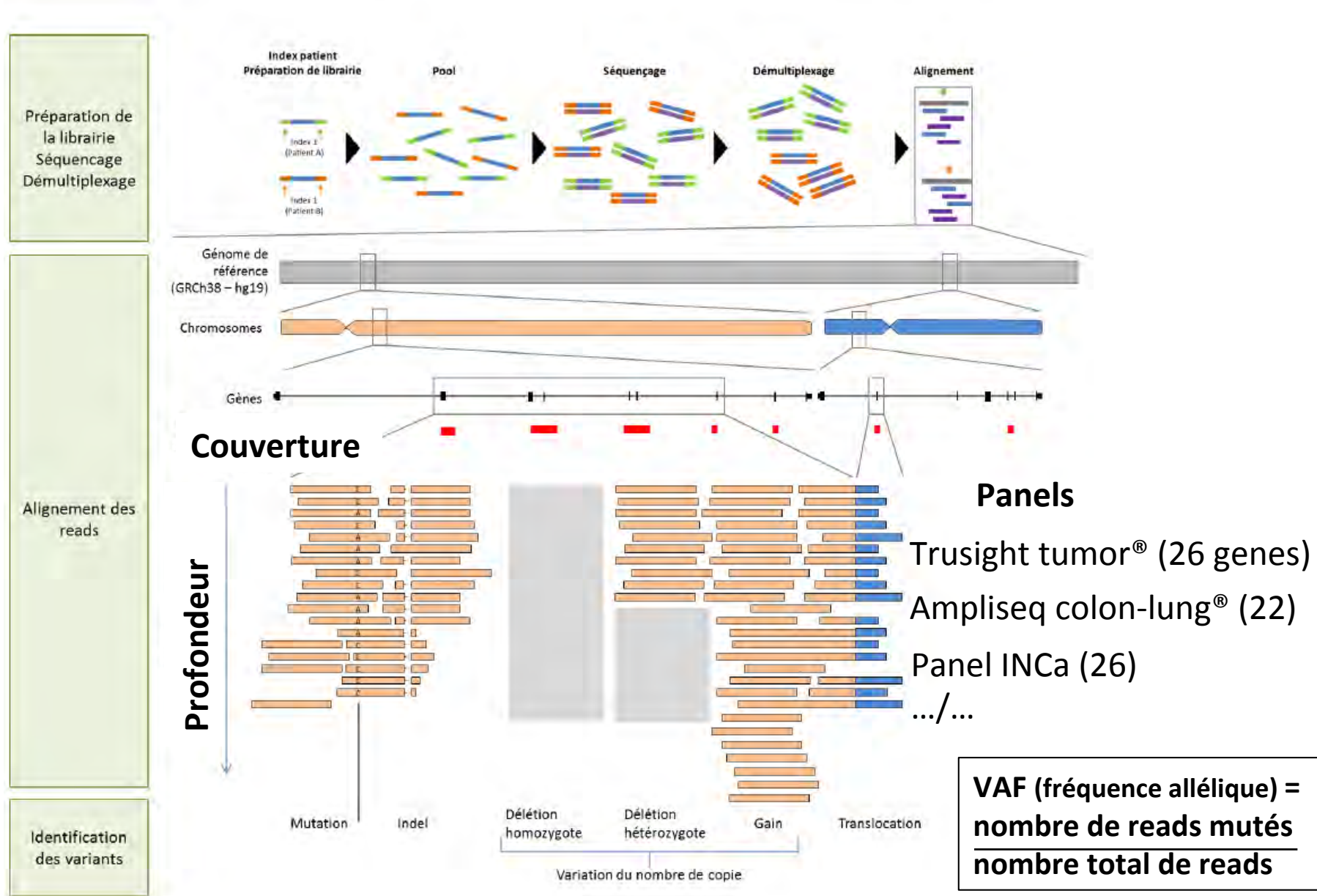
▪ 26 900 tests par NGS dans les tumeurs solides (10 400 en 2015)

Déploiement NGS dans le cancer du poumon



Le NGS - ciblé

Critères INCa
Nombre de Reads > 300 et VAF > 4%



Les oncogènes drivers *les mutations*

Les mutations: ciblables ou non

Classe 5 avec AMM	Variant actionnable validé.	Variants rendus en routine
Classe 5 hors AMM	- Variant actionnable pour lesquels il y a une AMM dans une autre pathologie ou des essais clinique ouverts. - Variant de signification pronostique ou diagnostique.	
Classe 4	Variant sans effet thérapeutique connu mais avec un effet sur la fonction de la protéine connu.	Variants à discuter en RCP moléculaire
Classe 3	Variant de signification inconnue.	
Classe 2	Variant probablement neutre.	
Classe 1	Polymorphisme constitutionnel.	

Oncogènes
drivers
validés

Oncogènes
drivers
potentiels

Oncogènes
non drivers

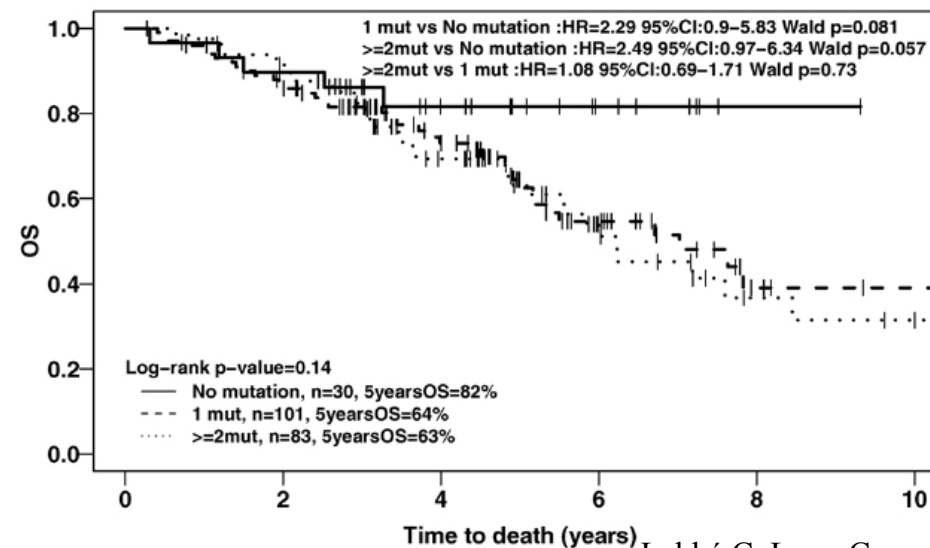
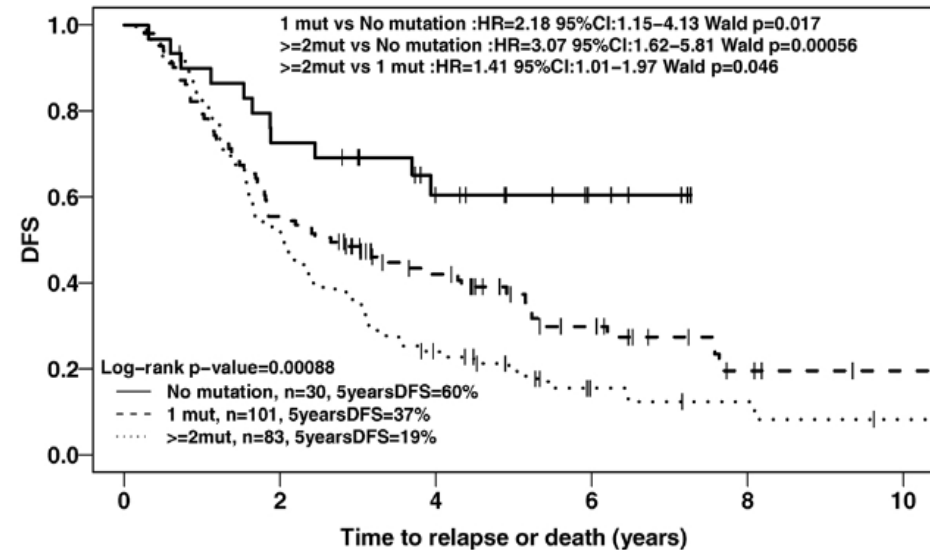
Les oncogènes drivers *les mutations*

- Le NGS : résultats



Demographic factors (number of patients)	No mutations N = 30	1 mutation N = 101	Multiple mutations (≥ 2) N = 83	P
Age	65 (35-81)	65 (45-84)	59 (30-89)	0.0006
Sex				
Female (114)	19 (63)	43 (43)	52 (63)	0.012
Male (100)	11 (37)	58 (57)	31 (37)	
Ethnicity				
Caucasian (155)	20 (67)	78 (77)	57 (69)	0.14
Asian (47)	10 (33)	19 (19)	18 (21)	
Other (12)	0 (0)	4 (4)	8 (10)	
Smoking history				
Non-smoker (69)	16 (53)	22 (22)	31 (37)	0.002
Smoker (145)	14 (47)	79 (78)	52 (63)	
Stage				
I (79)	13 (43)	38 (38)	28 (34)	0.46
II (76)	11 (37)	38 (38)	27 (32)	
III (59)	6 (20)	25 (24)	28 (34)	
Histology				
Adenocarcinoma (158)	19 (63)	66 (65)	73 (88)	0.0001
Non- adenocarcinoma (56) ^a	11 (37)	35 (35)	10 (12)	
Adjuvant chemotherapy				
Yes (105)				0.18
No (109)	12 (40)	46 (45)	47 (57)	
	18 (60)	55 (55)	36 (43)	

n = 214, stades précoces opérés
Panel NGS Truseq® 48 gènes



Les oncogènes drivers

les mutations

- Le NGS: problématiques
 - Oncogènes drivers/potentiels/non drivers ?
 - Variants rares?
 - Mutations additionnelles aux drivers?
 - Quelle valeur ajoutée?
 - Délai de rendu??
 - Coût ...

Les oncogènes drivers

les mutations

Techniques

Sensibilité

Tissu

Séquençage par la méthode Sanger

> 10%

Tissu tumoral

Pyroséquençage

5-10%

Tissu tumoral

High resolution melting (HRM, courbes de fusion en qPCR)

5%

Tissu tumoral

Séquençage de nouvelles générations

1-5%

Tissu tumoral ADNtc

qPCR en temps réel (Taqman®)

1-10%

Tissu tumoral ADNtc
(Nombre restreint de cibles)

Spectrométrie de masse, MassArray®

0,1-1%

Tissu tumoral ADNtc
(Nombre restreint de cibles)

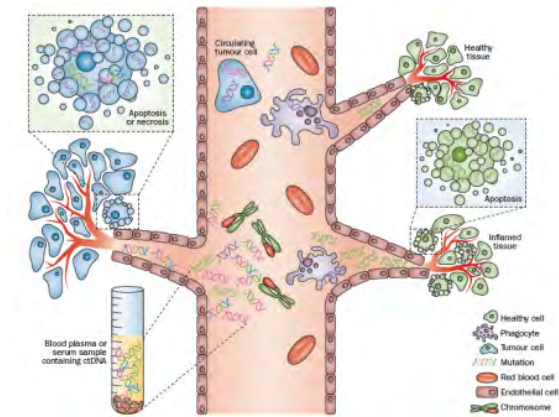
PCR digitale en microcompartiments

< 0,001%

Tissu tumoral ADNtc
(Nombre restreint de cibles)

Les oncogènes drivers les mutations - ADNtc

Platform	Patients	Alteration	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Concordance (%)
cobas	238 patients from the FASTACT-2 study	L858R and exon 19 deletion	96	75	88
cobas	196 patients with LUAD	L858R and exon 19 deletion	96	60	91
qPCR	96 patients from EURTAC study with either L858R or exon 19 deletion	L858R and exon 19 deletion	—	78	—
ddPCR	120 newly diagnosed patients with nonsquamous NSCLC with either L858R or exon 19 deletion	EGFR exon 19 deletion	100	86	91
		EGFR L858R mutation KRAS G12X mutation	100	69	80
ddPCR	58 patients from South Korea	L858R exon 19 deletion	—	70.8	87.9
			—	76.5	86.2
BEAMing	Retrospective cohort of 216 patients from the AURA-1 study	L858R exon 19 deletion	97	86	—
			98	82	—
BEAMing	38 patients from the AURA 1 trial	L858R exon 19 deletion	100	93	95
			93	100	95
cobas	38 patients from the AURA 1 trial	L858R exon 19 deletion	100	90	97
			100	86	89
ddPCR	38 patients from the AURA 1 trial	L858R	100	90	97
			97	87	—
BEAMing	72 patients from the AURA 1 trial	L858R exon 19 deletion	97	82	—
			97	82	—
Cobas	72 patients from the AURA 1 trial	L858R exon 19 deletion	97	82	—
			97	82	—
Cobas	226 patients from the AURA 3 trial	L858R exon 19 deletion	100	59	—
			99	85	—
ddPCR	208 patients from the AURA 3 trial	L858R exon 19 deletion	98	69	—
			100	72	—
NGS	227 patients from the AURA 3 trial	L858R exon 19 deletion	99	62	—
			99	81	—
BEAMing	Retrospective cohort of 44 patients with confirmed EGFR mutated status	EGFR activating alterations	—	72.7	—
NGS	Prospectively enrolled cohort of 165 patients with stage III-IV solid tumors	54 genes pane	99	85	—
NGS	50 prospectively enrolled patients with NSCLC	70 genes panel	—	—	79
NGS	68 nonsmoker patients with NSCLC	EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2, and PI3KCA genes	87	58	68
qPCR	Cohort of 32 patients with NSCLC - with 14 patients having an ALK rearrangement confirmed by primary tumor real-time PCR and/or FISH	ALK rearrangement	100	21	—
ddPCR	Retrospective cohort of 102 consecutive patients with lung adenocarcinoma	ALK rearrangement	100	93	—
NGS	88 retrospectively enrolled consecutive patients with LUAD	EGFR alterations detection	—	—	80.8
NGS	100 patients with NSCLC	EGFR alterations detection	—	—	79
qPCR	Retrospective cohort of 107 patients with lung adenocarcinoma	BRAF mutation	93	28.6	—
NGS	48 patients with advanced, progressive NSCLC	Different alterations	100	77	—



- Mutations activatrices de l'EGFR
- Techniques:
 - qPCR, Cobas[®]
 - dPCR (ddPCR, BEAMing)
 - NGS (si nombre de copies suffisant)

- Sensibilité : 62-93%
- Spécificité: 90-97%



Si test négatif

- Biopsie tissulaire
- Refaire biopsie liquide

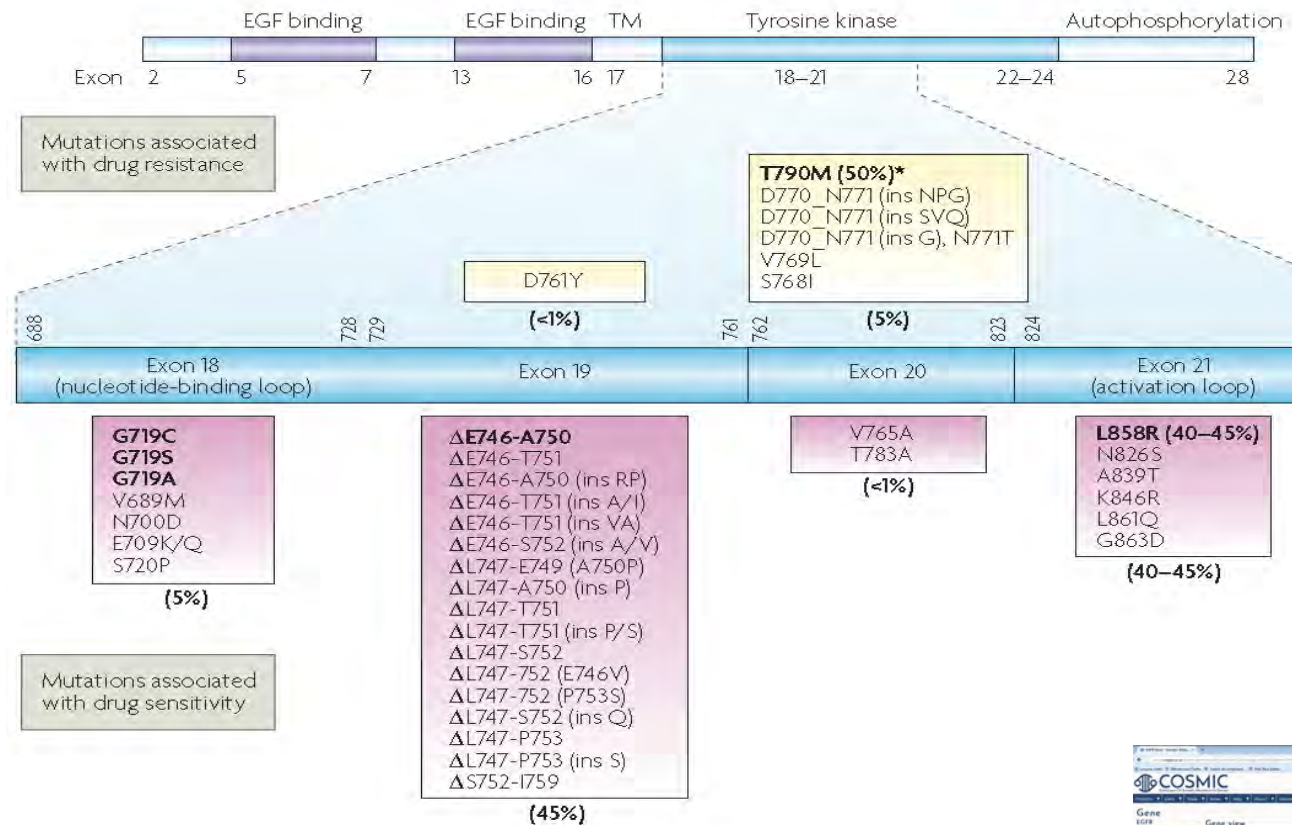
Les oncogènes drivers

les mutations

	Fréquence	Biopsie tissulaire	Biopsie liquide
Altération moléculaire en routine			
Mutations		+++	+++
<i>EGFR</i> activatrices exons 18-19-20*-21	10%		
- Communes (90%): del 19, L858R (exon 21)			
- Rares (10%): G179X (exon 18), S768I (exon 20), L861Q (exon 21) ...			
<i>BRAF</i> exons 11-15	3%		
- G469A (40%)			
- D594G (11%)			
- V600X (50%)			
Altérations moléculaires recommandées			
Mutations		+++	+++
<i>HER2</i> exon 20	1-2%		
<i>MET</i> Δ14	3-5%		
<i>KRAS</i>	30%		

Mutations *EGFR*: communes, rares, complexes

- Récepteur membranaire à activité tyrosine-kinase
- 28 exons

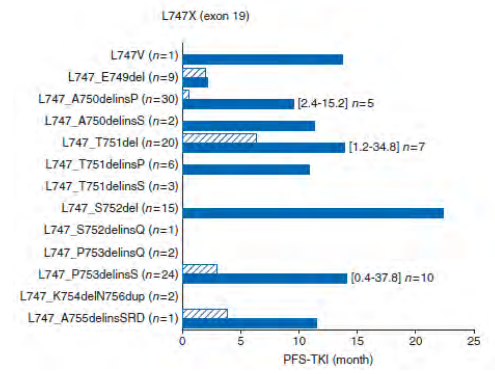
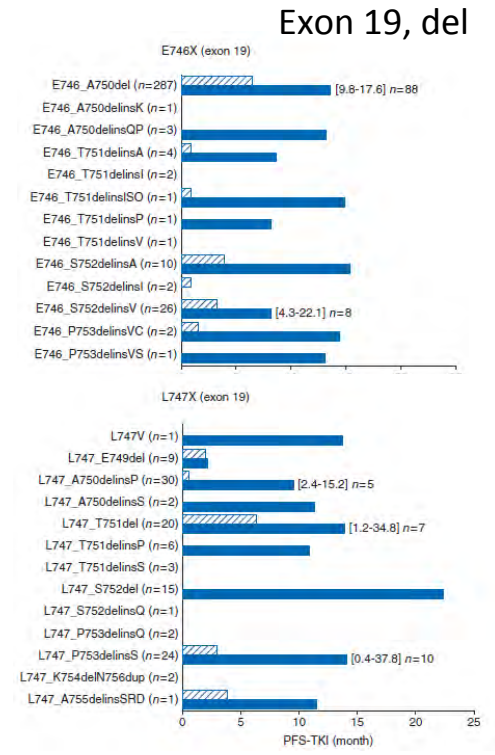
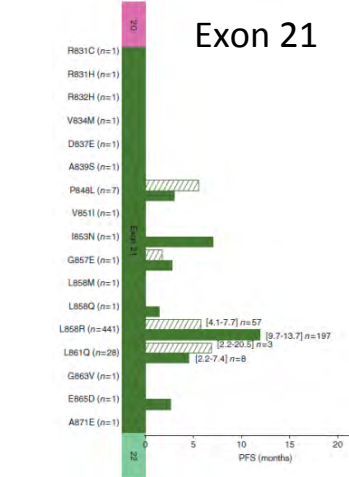
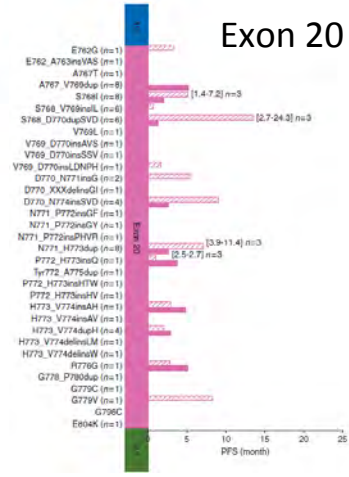
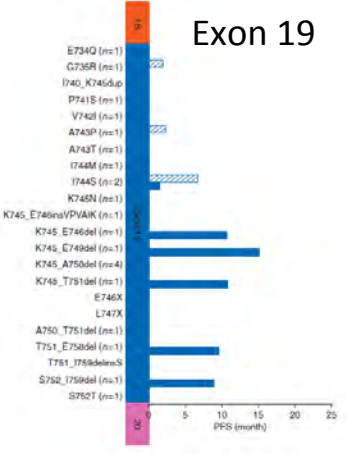
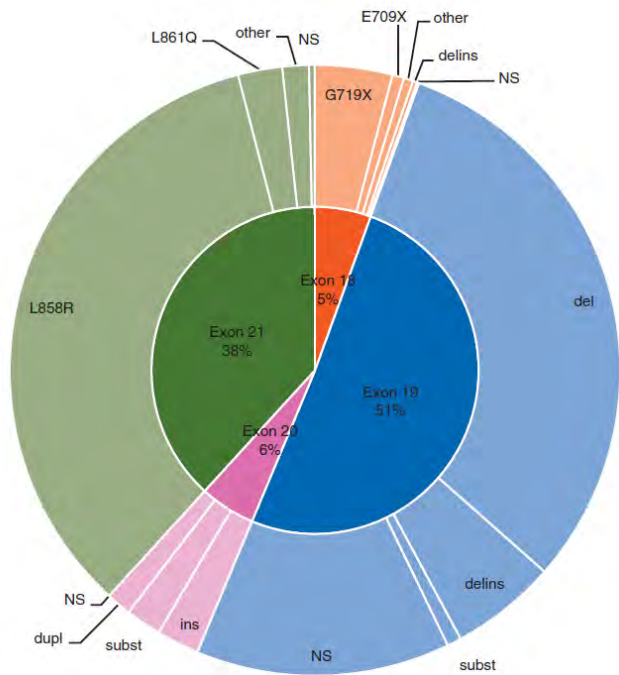


COSMIC data base: <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>
MyCancerGenome: <https://www.mycancergenome.org/>

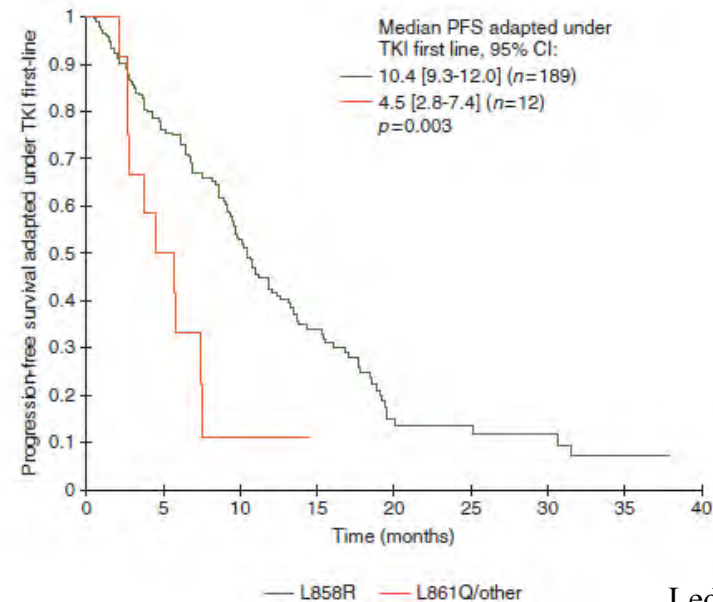
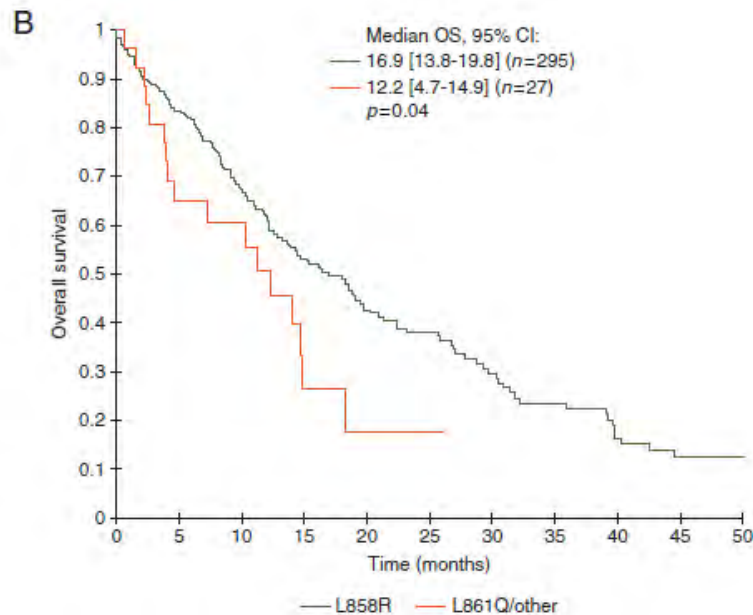
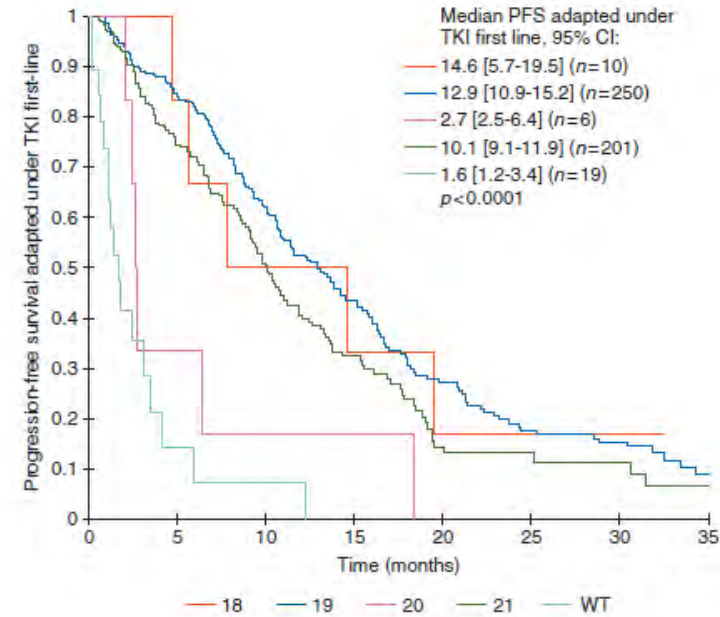
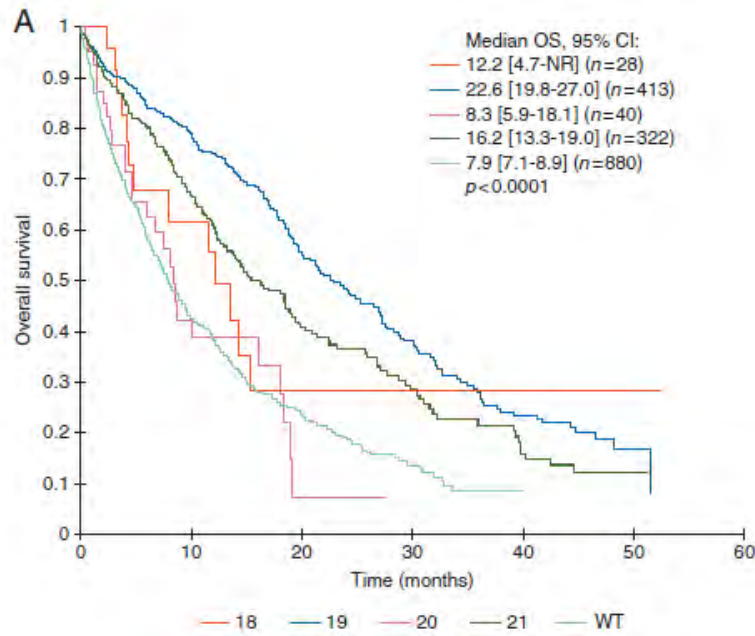
.../...

Mutations *EGFR*: communes, rares, complexes

- Biomarqueur France
- 848 patients mutés *EGFR* (11%)

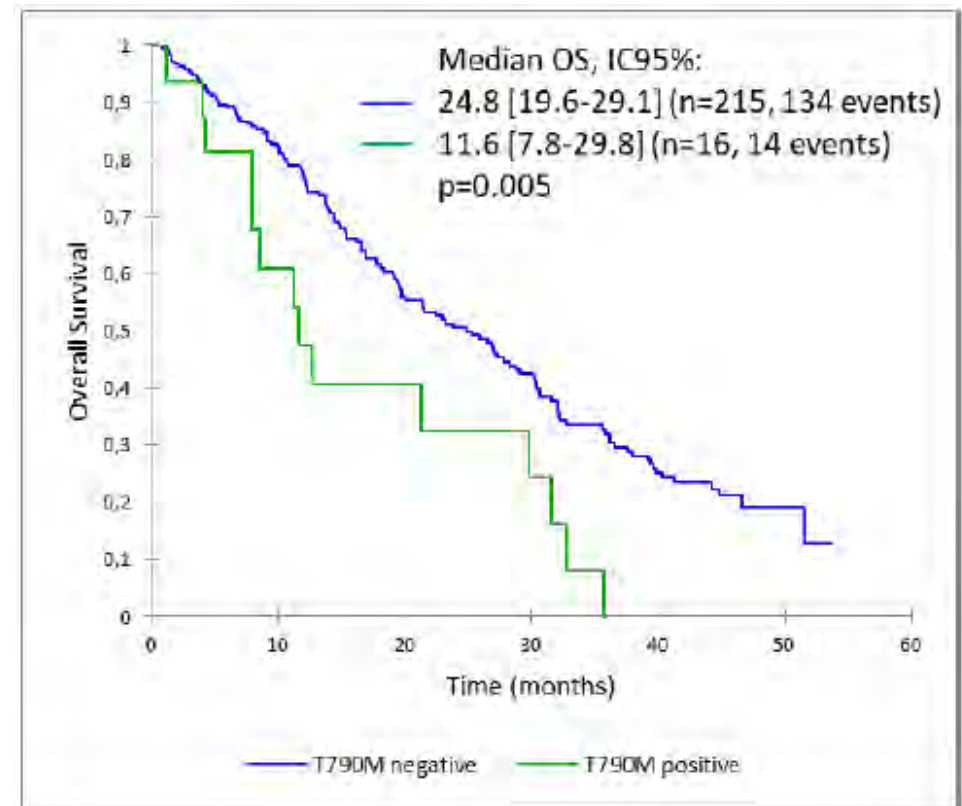
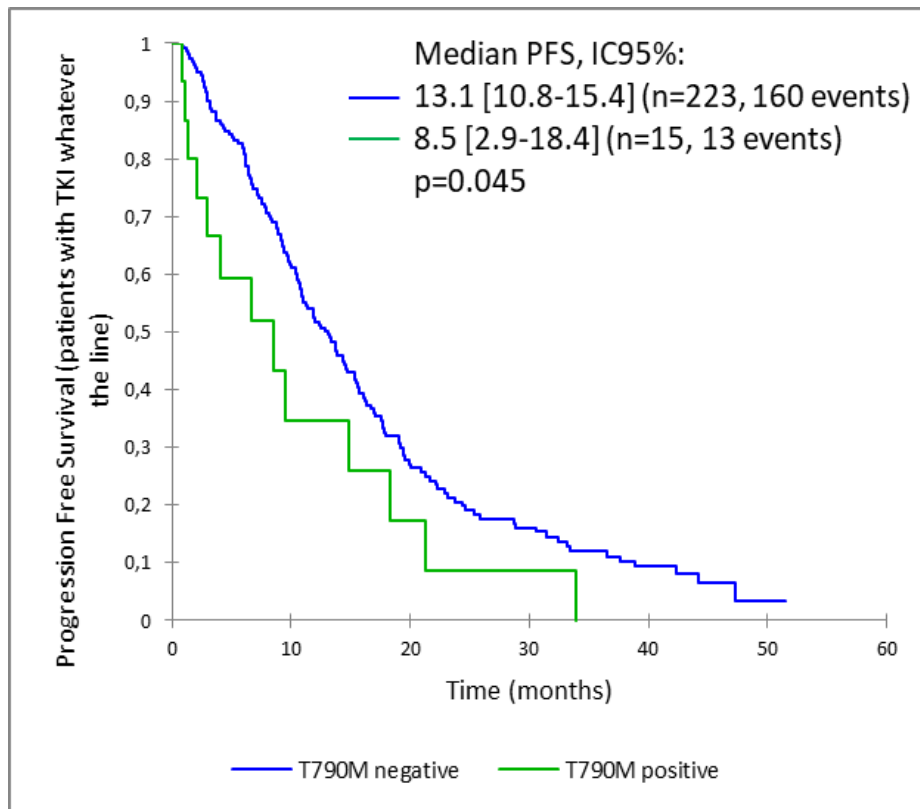


Mutations *EGFR*: communes, rares, complexes



Les oncogènes drivers les mutations *EGFR*

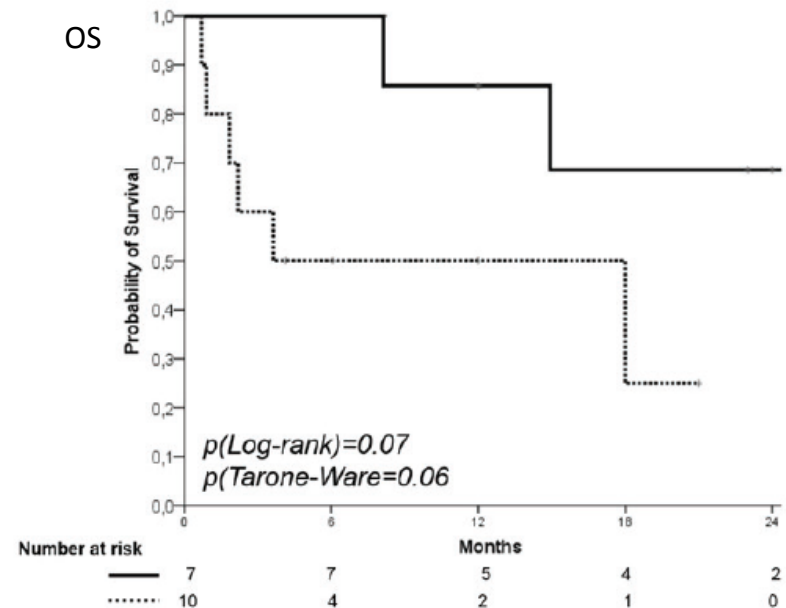
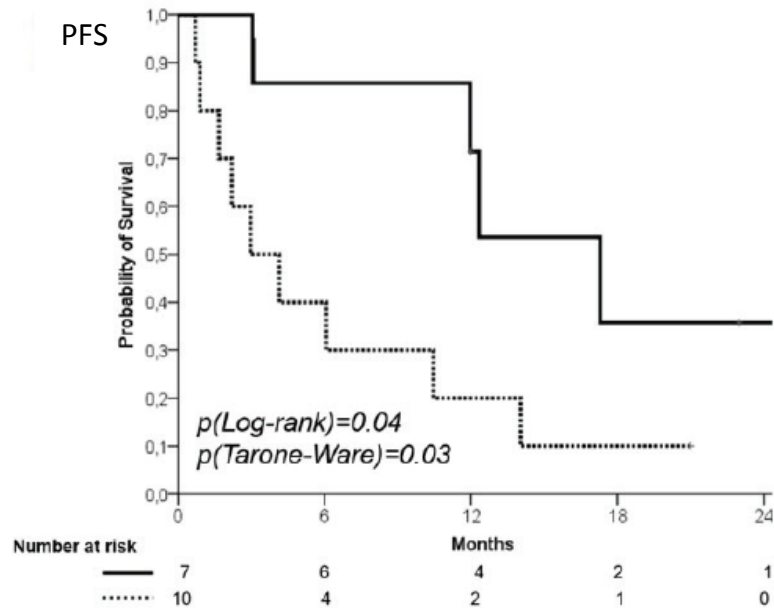
- La PCR digitale: quid des sous-clones mutés?
- Exemple de la mutation T790M



Les oncogènes drivers les mutations *EGFR*

- Apport du NGS

n = 17, stades avancés, *EGFR*m
 Traités par gefitinib
 Panel NGS ColonLung® 22 gènes



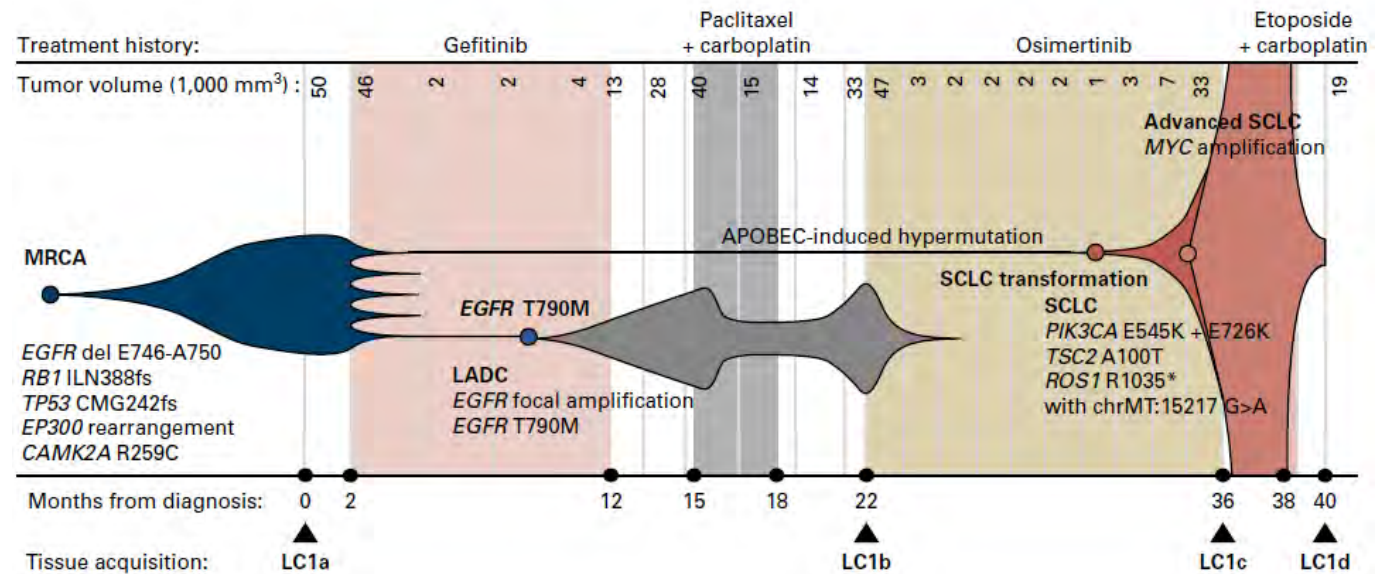
- Absence de mutation additionnelle + VAF *EGFR* $\geq 0,36$
- ... présence de mutation additionnelle + VAF *EGFR* $< 0,36$

Les oncogènes drivers les mutations *EGFR* et transformation histologique

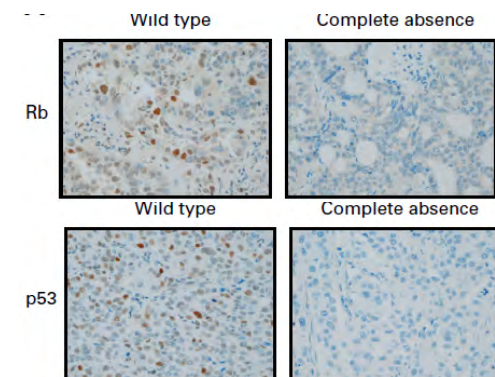
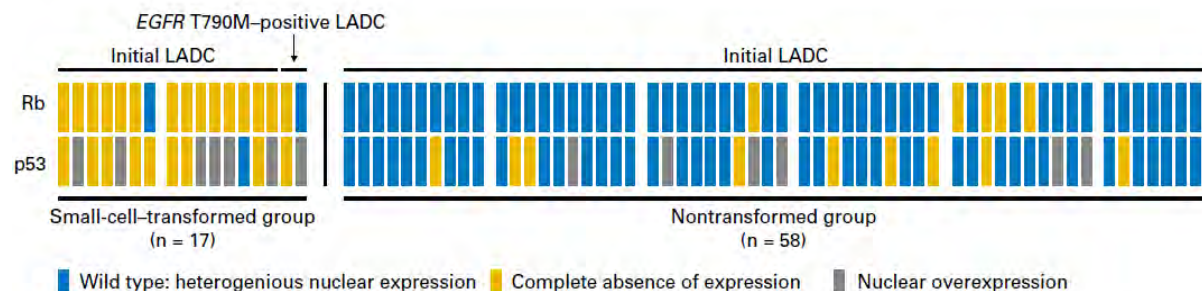
- Apport du NGS / WES (n=9)

Le clone inducteur est présent au diagnostic

- mutation *RB1*
- mutation *TP53*

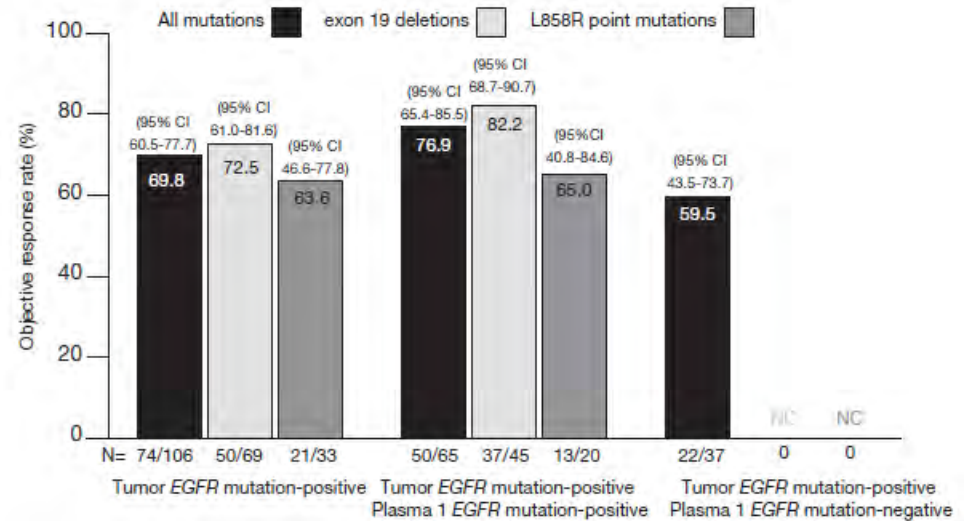


n=75, immunohistochimie, 82% versus 3%



Les oncogènes drivers les mutations *EGFR* et biopsies liquides - ctDNA

- Phase IV, gefitinib (n=1060)



Median PFS

	Tumor (FAS, n = 106)			Plasma 1 (n = 65)		
	PFS Events, n	Median PFS, mo	95% CI	PFS Events, n	Median PFS, mo	95% CI
All mutations	61	9.7	8.5–11.0	36	10.2	8.5–12.5
Exon 19 deletions	41	9.6	8.0–11.0	25	10.3	8.5–12.4
L858R point mutations	19	NC	NC	11	NC	NC

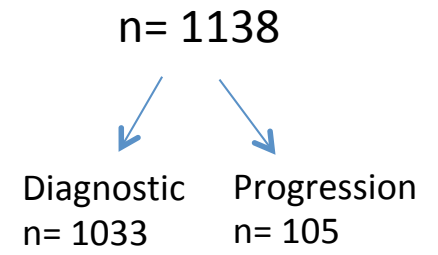
- ✓ Extension d'AMM pour gefitinib (EMA)
- ✓ Extension d'AMM pour gefitinib avec test Cobas® (FDA)

Les oncogènes drivers

les mutations *EGFR* et biopsies liquides - ctDNA

Table 2. Treatment results and genotyping for 18 patients treated with TKIs first line based exclusively on a positive result of the *EGFR* mutation test in blood

Patient code	<i>EGFR</i> mutation	Gender	Age	Smoking status	Treatment	Response	PFS
14724	Del exon 19	M	65	Smoker	Erlotinib	PR	11 months
14675	Del exon 19	F	66	Non smoker	Gefitinib	PR	7 months
11965	p.L858R	M	78	Non smoker	Gefitinib	PD	-
15124	p.L858R	F	71	Non smoker	Gefitinib	PR	5 months
19330	p.L861Q	F	73	Non smoker	Gefitinib	SD	-
19537	p.L858R	F	65	Non smoker	Erlotinib	PD	-
24343	Del exon 19	F	55	Non smoker	Afatinib	PR	Ongoing
22107	p.L861Q	F	77	Non smoker	Gefitinib	PR	-
16735	p.L858R	F	69	Ex-smoker	Erlotinib	PR	8 months
21033	p.L858R	M	61	Ex-smoker	Gefitinib	PR	-
14827	p.L858R	F	73	Non smoker	Erlotinib	PD	-
13460	Del exon 19	M	59	Non smoker	Erlotinib	PR	12 months
20757	Del exon 19	F	52	Non smoker	Erlotinib	PR	12 months
16509	p.L858R	M	71	Smoker	Erlotinib	SD	-
16267	Del exon 19	F	67	Non smoker	Gefitinib	PR	-
21543	Del exon 19	F	63	Non smoker	Gefitinib	PR	-
22729	p.L858R	F	67	Non smoker	Gefitinib	PR	-
13739	Del exon 19	M	62	Unknown	Erlotinib	PR	18 months



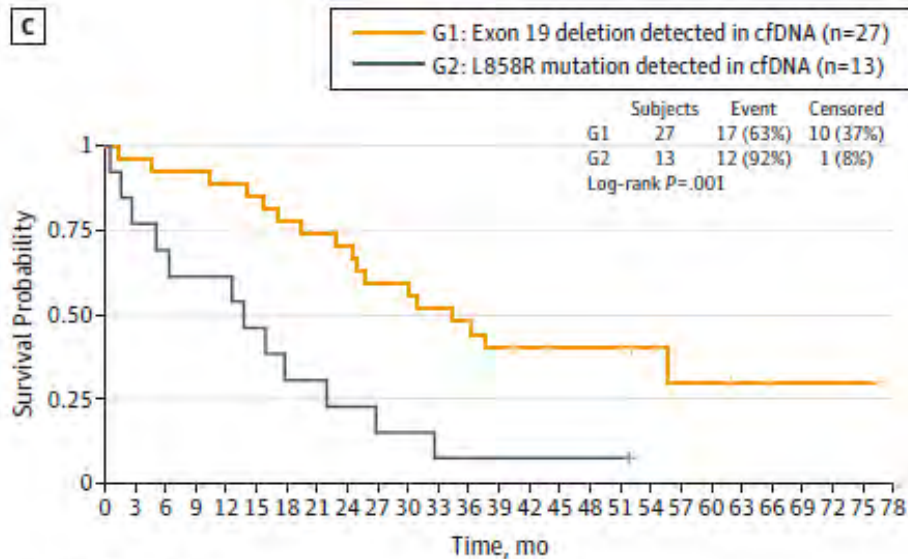
EGFRm 11%

ORR 72% **PFSm 11 mois**

- Pronostic quand mutation est détectée uniquement dans le plasma (n=18)
- Possibilité de
 - Répéter les biopsies liquides
 - De monitoring: à la progression, mutation *EGFR* activatrice (56,2%) et T790M (31%)

Les oncogènes drivers les mutations *EGFR* et biopsies liquides - ctDNA

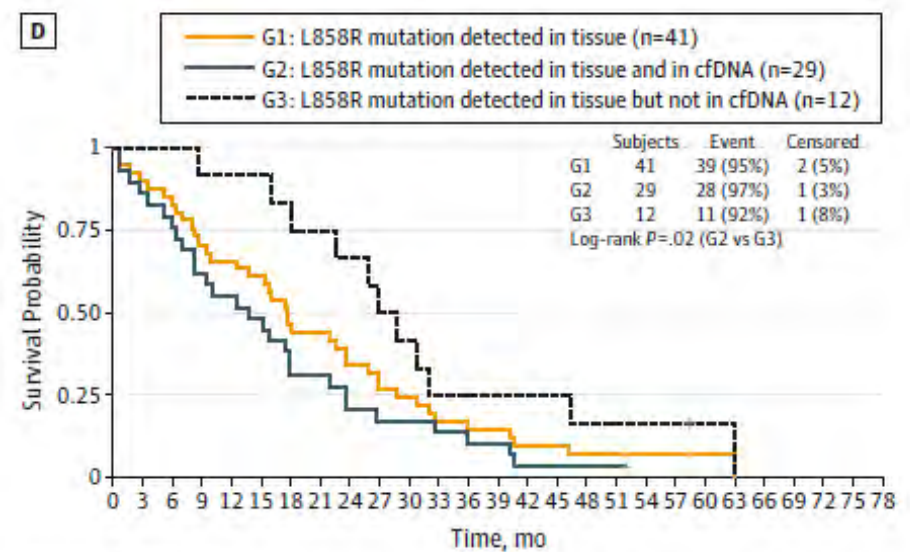
Del19/L858R



Patients at Risk, No.

G1	27	26	25	25	24	23	21	20	19	16	15	14	13	10	8	7	7	6	5	3	3	2	1	1	1	1	0	
G2	13	10	9	8	8	6	4	4	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

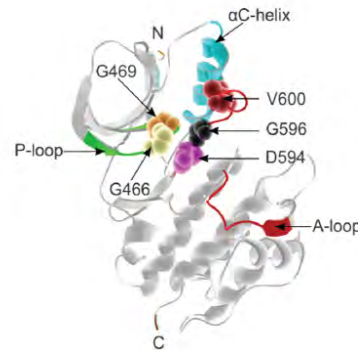
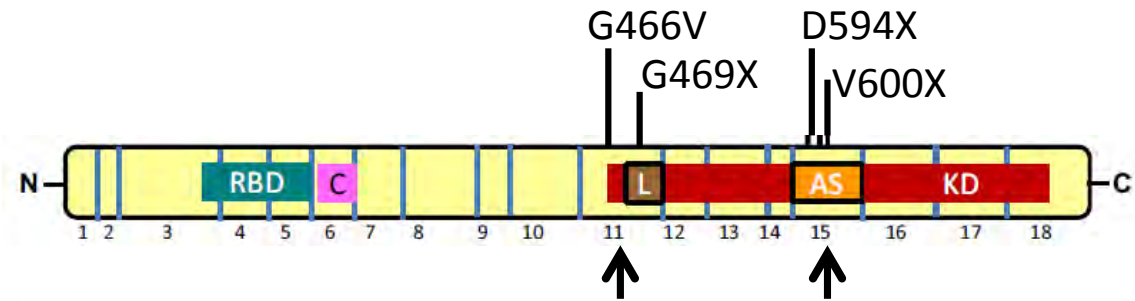
L858R: tissu /plasma



Patients at Risk, No.

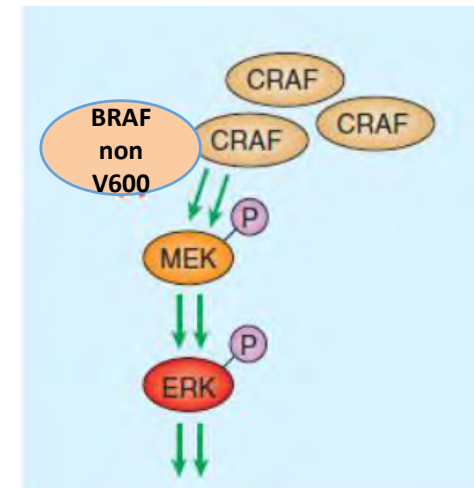
G1	41	37	35	29	27	25	19	18	14	11	10	7	6	6	4	4	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0
G2	29	25	23	18	16	14	9	9	6	5	5	4	3	3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G3	12	12	12	11	11	11	10	9	8	6	5	3	3	3	3	3	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0

Les oncogènes drivers les mutations *BRAF*



Mutation	Frequency in NSCLC
V600E	57%
G469A	22%
D469V	13%
D594G	6%
V600M	2%

- Mutations autres que V600, exons 15 et 11
 - Augmentent l'activité kinase
 - OU déficience de l'activité kinase: activation ERK via CRAF
 - Quelle valeur prédictive ?
 - ACSé vémurafenib: étude *in silico* pour les mutations dans le domaine TK, qui ne sont pas des polymorphismes, mutations faux-sens ou delins en phase: absence de réponse pour les mutations non-V600



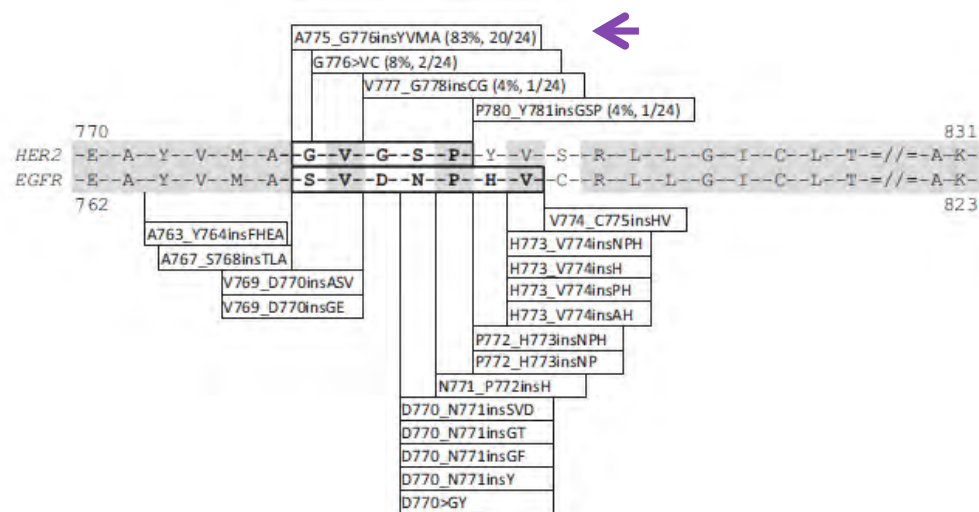
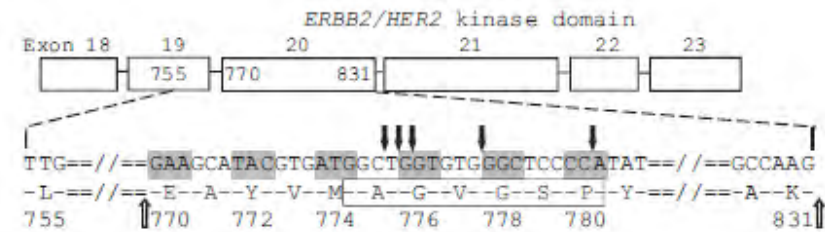
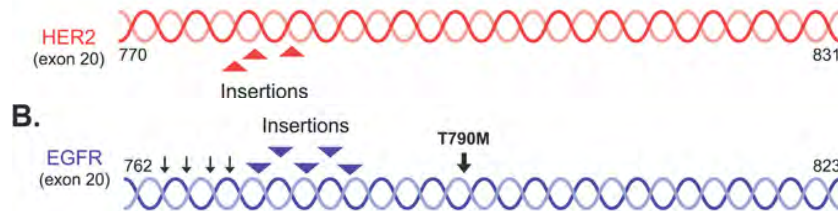
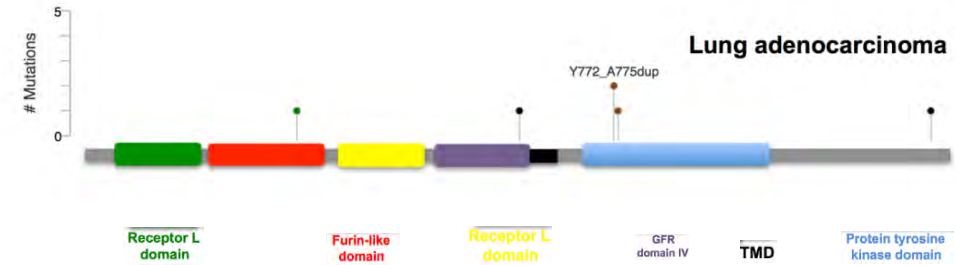
Planchard D, Lancet Oncol 2016, 2017; Caprarica R, CROH 2016

Noeparast A, Oncotarget 2017; Baik CS, The Oncologist 2017; L Mazières J, WLCL 2018

Les oncogènes drivers

HER2

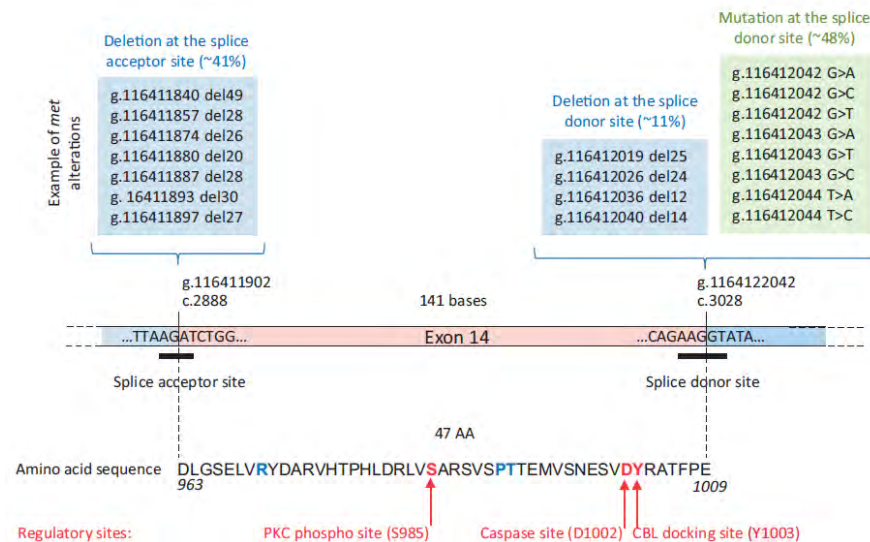
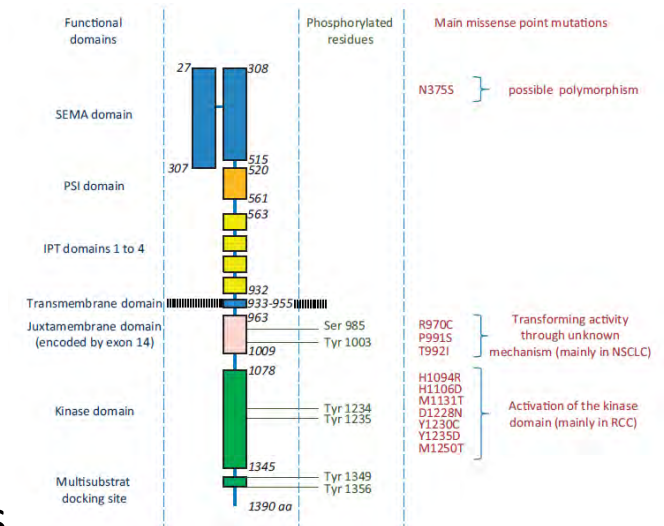
- 27 exons
- Mutations récurrentes: insertions/duplications exon 20 (3-12pb)
p.A775_G776insYVMA: 80%
- Quid des substitutions? Indel?
- Autres exons (exon 19, exon 21)?



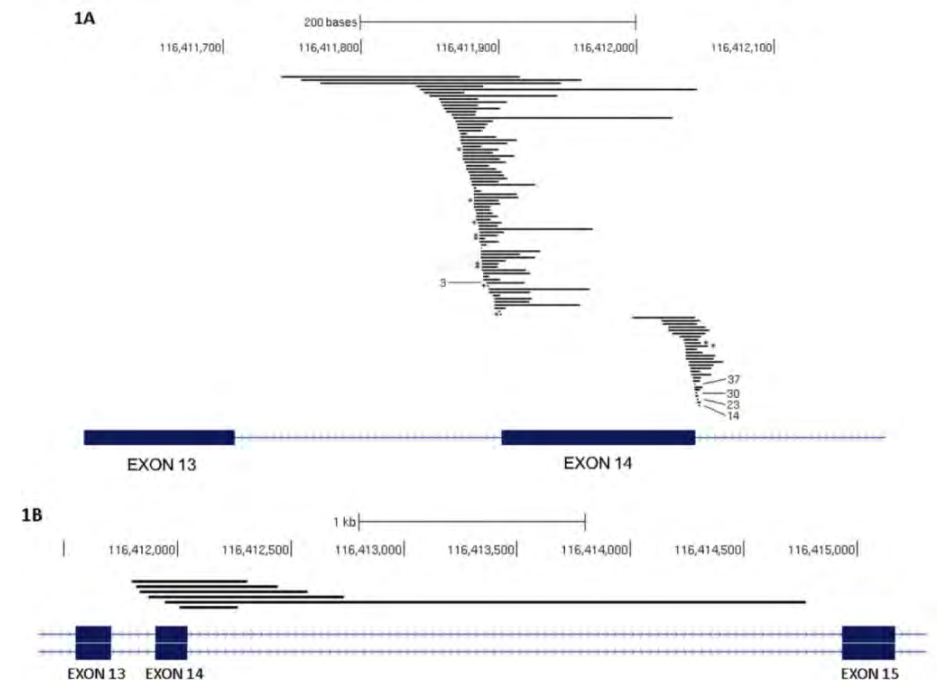
Les oncogènes drivers

Mutation *MET*, Δ14

- Mutation Δ14
 - Exclusive des mutations d'*EGFR* et *KRAS*
 - Panel NGS ciblé modifié et/ou autres techniques



- Autres mutations
 - Impact fonctionnel reste à valider



Les oncogènes drivers- exclusivité des mutations

162 (0,9%) patients avec double ou triple altération

Gene	n (%)	EGFR	KRAS	ALK	BRAF	PIK3CA	HER2
EGFR	67 (40.6%)		24 (15%)	10 (6%)	5 (3%)	28 (17%)	0
KRAS	108 (65%)	24 (15%)		22 (13%)	9 (5%)	53 (32%)	0
ALK	37 (22.4%)	10 (6%)	22 (13%)		2 (1.2%)	2 (1.2%)	1 (0.6%)
BRAF	22 (13.3%)	5 (3%)	9 (5%)	2 (1.2%)		5 (3%)	1 (0.6%)
PIK3CA	88 (53%)	28 (17%)	53 (32%)	2 (1.2%)	5 (3%)		0
HER2	2 (1.2%)	0	0	1 (0.6%)	1 (0.6%)	0	

Co-alteration	Prevalence (n, % of Total Double Mutations)	Prognostic Impact	Response to Targeted Therapy	Response to Chemotherapy
EGFR/KRAS	n = 24 (15%)	Detrimental impact of <i>KRAS</i> (PFS, trend for OS)	Possible negative impact of <i>KRAS</i> on response to EGFR TKI	None
EGFR/PIK3CA	n = 28 (17%)	Detrimental impact of <i>PIK3CA</i> (PFS, trend for OS)	Possible negative impact of <i>PIK3CA</i> on response to EGFR TKI (ORR 61% vs. 45%)	None
EGFR/ALK	n = 10 (6%)	None	None	None
KRAS/PIK3CA	n = 53 (32%)	None	NA	None
KRAS/ALK	n = 22 (13%)	Detrimental impact of <i>KRAS</i> (trend for OS)	Possible negative impact of <i>KRAS</i> on response to crizotinib	None

Etude ancillaire Biomarqueur France

Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
HER2, cMETd14, KRAS

Biopsie tissulaire

Si non réalisable/informatif:
biopsie liquide

Technique ciblée
NGS ciblé

Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
HER2, cMETd14, KRAS

Recherche de translocations
ALK, ROS1
RET, NRG1, NTRK

Biopsie tissulaire

Si non réalisable/informatif:
biopsie liquide

Technique ciblée
NGS ciblé

Les oncogènes drivers

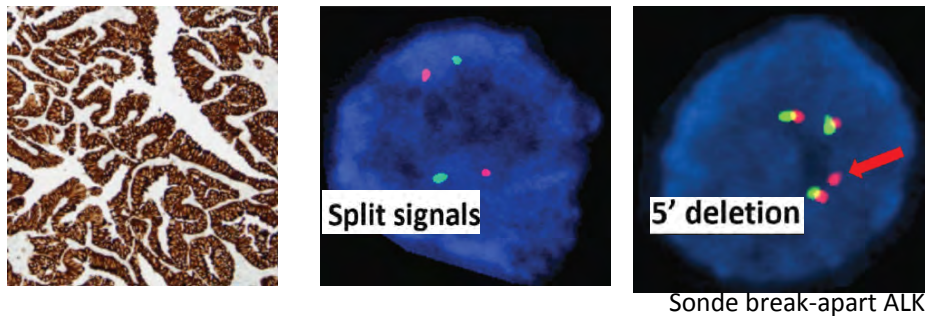
les translocations

	Fréquence	Biopsie tissulaire	Biopsie liquide
Altération moléculaire en routine			
Translocations		+++	+
<i>ALK</i>	5%		
<i>ROS1</i>	1-3%		
Altérations moléculaires recommandées			
Translocations		+++	+
<i>RET</i>	1%		
<i>NRG1</i>	<1%		
<i>NTRK</i>	0,1%		

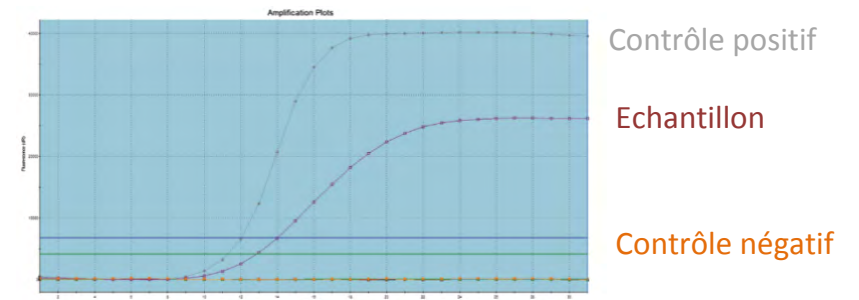
Les oncogènes drivers

les translocations

- IHC (ALK, ROS1)
- FISH (ROS1, RET, NRG1)



- RT-PCR



- NGS
 - Technologie ARN /ADN
 - Panels: InVisionFirst[®], FoundationOne[®], Trusight RNA Fusion panel[®], AmpliSeq fusion panel[®], SolidTumor[®], Oncomine Focus Assay RNA panel[®], Human Lung Cancer panel[®], ...

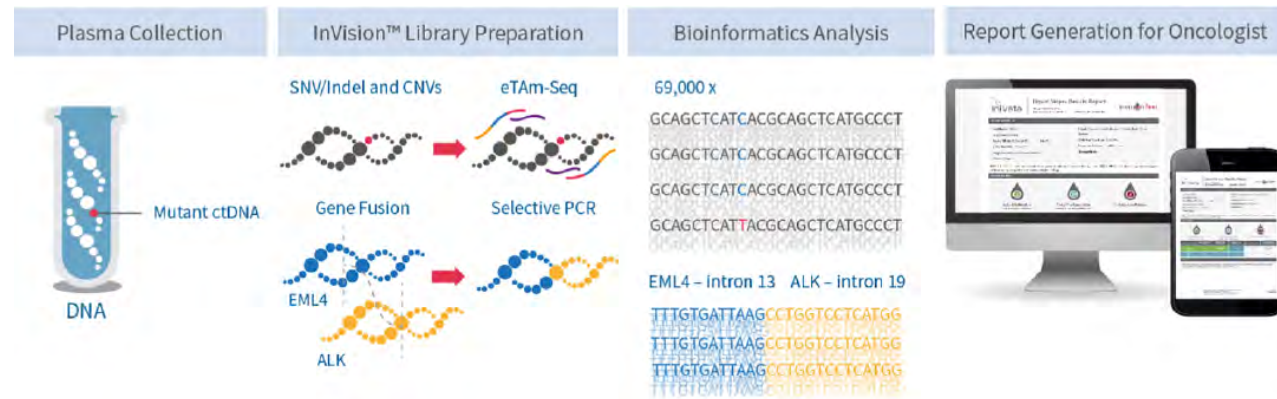
Table 4. Accuracy of FISH and IHC for EML4-ALK based on 51 cases with next-generation sequencing as the gold standard

Method	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
IHC, %	100	97.7	87.5	100
FISH, %	42.9	97.7	75	91.4

Les oncogènes drivers

les translocations-biopsie liquide

- Cellules tumorales circulantes –(
- Plasma



InVisionFirst™ Fusion coverage

Gene	Introns and Exons covered
EML4	Intron 5 to Exon 7, Intron 12 to Exon 14, Intron 19 to Exon 21
ALK	Exon 19 to Intron 21
ROS1	Intron 31 to Exon 34
SLC34A2	Exon 4 to Intron 4 and intron 12 into 3' UTR
SDC4	Exon 2 to Intron 2 and Exon 4 to Intron 4
CD74	Exon 6 to Intron 6
EZR	Exon 10 to intron I10

Les oncogènes drivers

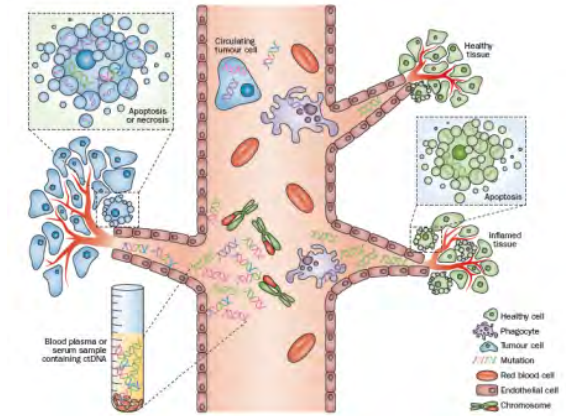
les translocations-biopsie liquide

	Cohort 1 (new Dx or new <i>ALK</i> Dx)	Cohort 2 (<i>ALK</i> TKI progression)	Cohort 3 (unknown clinical status)	Cohort 4 (EGFR TKI progression)	All ^a
Patients (N)	42	31	13	6	91
Gender					
Female	22 (52%)	15 (48%)	6 (46%)	3 (50%)	46 (51%)
Male	20 (48%)	16 (52%)	7 (54%)	3 (50%)	45 (49%)
Age, years					
Average (range)	54.6 (27-84)	50.7 (27-73)	58.6 (46-82)	61.2 (43-71)	54 (27-84)
cfDNA-detected fusion (by sample)					
<i>EML4-ALK</i>	40	24	13	5 ^b	82
<i>STRN-ALK</i>	—	—	—	6 ^b	6
<i>KCNQ-ALK</i>	—	1	—	—	1
<i>KLC1-ALK</i>	—	3	1	—	4
<i>KIF5B-ALK</i>	1	—	—	—	1
<i>PPM1B-ALK</i>	—	1	—	—	1
<i>TFG-ALK</i>	1	—	—	—	1
Not detected	—	5	—	—	5
Total	42	34	14	11	101

NGS - Guardant360[®]

Les oncogènes drivers

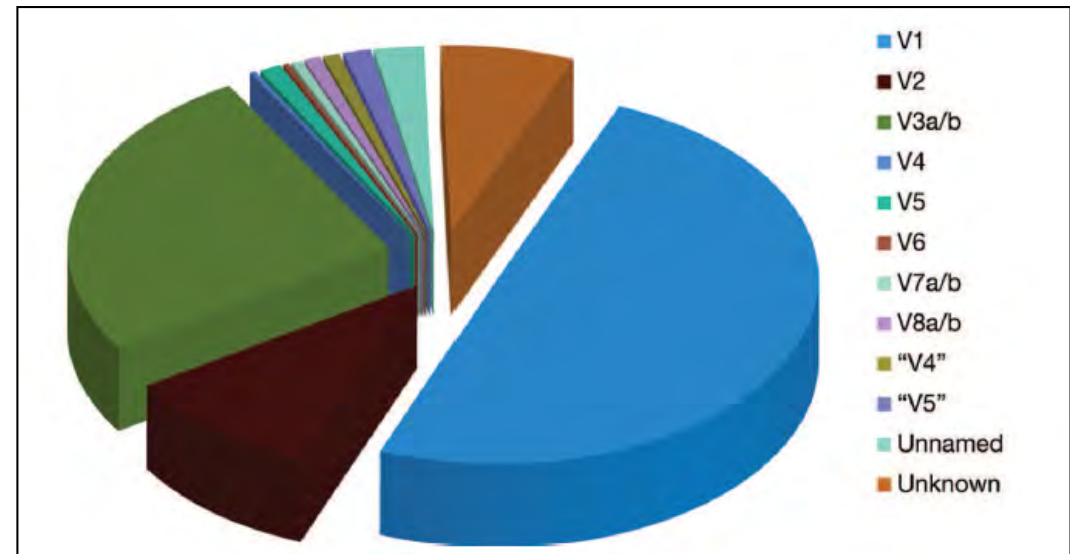
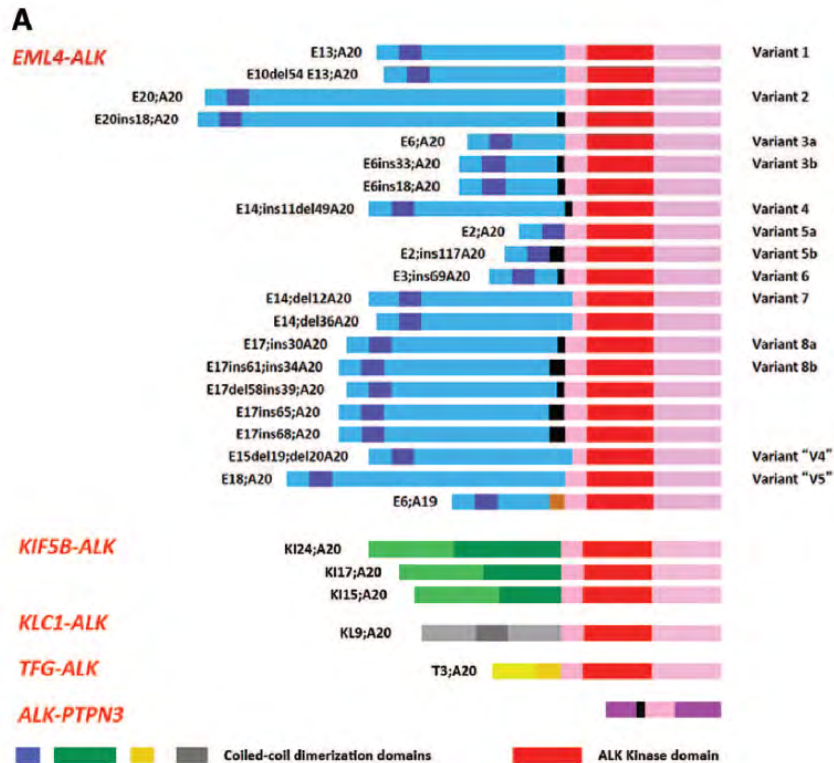
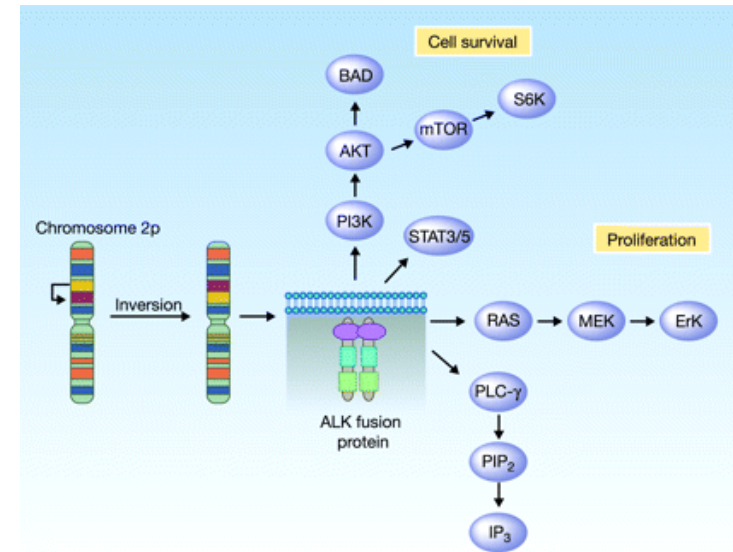
les translocations-biopsie liquide



- Beaucoup moins de données disponibles que pour les mutations d'*EGFR*
- Manque de cohortes prospectives
- Quelle technique?
 - Pas la qPCR
 - ddPCR
 - NGS

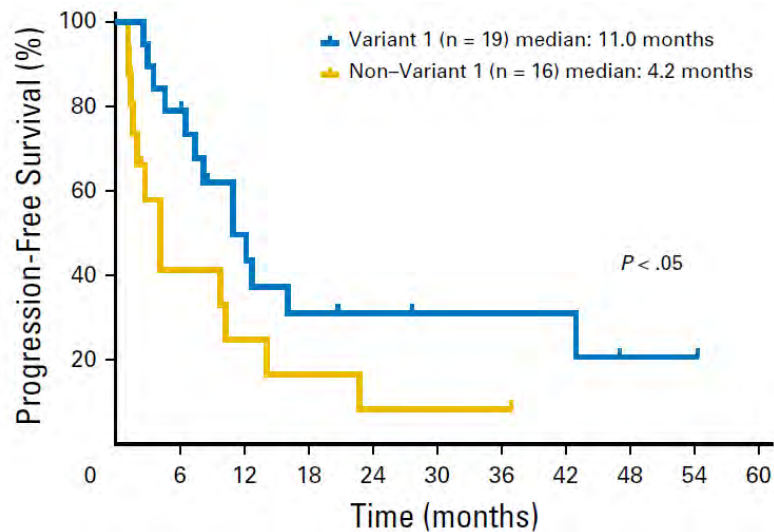
Les oncogènes drivers *les translocations ALK*

- 2p23
- Données cliniques: 5%
 - Petit fumeur ou non-fumeur
 - Âge jeune
 - adénocarcinome



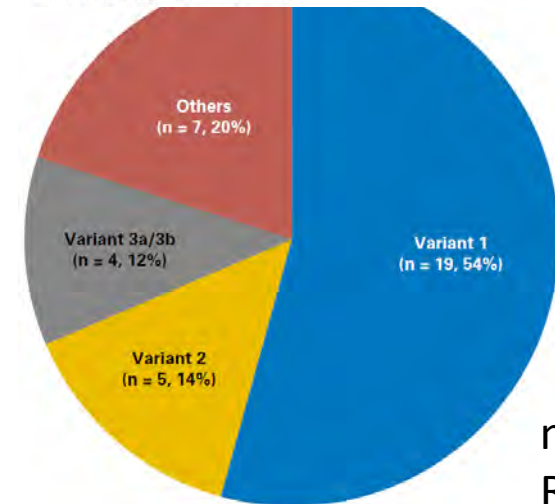
Les oncogènes drivers *les translocations ALK*

- Valeur prédictive au crizotinib des différents variants de fusion ??



Others included:

Variant 3 (n = 1), variant 5 (n = 1),
 variant 5b (n = 1), variant 5' (n = 1),
 E13ins60;A20 (n = 1), E12ins51;A20 (n = 1),
 E17ins27;A20 (n = 1)



n = 35
RT-PCR

Variable	Univariable Analysis, <i>P</i>	Multivariable Analysis	
		Hazard Ratio (95% CI)	<i>P</i>
Age (< v ≥ 70 years)	.339	—	—
Sex (male v female)	.128	0.936 (0.300 to 2.999)	.910
Performance status (0-1 v 2-3)	.032	0.727 (0.228 to 2.56)	.371
Smoking (yes v no)	.067	1.886 (0.538 to 6.743)	.322
Stage (IIIB, IV v postoperative recurrence)	.012	4.646 (1.381 to 21.750)	.009
Treatment line (first v nonfirst)	.155	0.591 (0.148 to 1.957)	.401
Brain metastasis (yes v no)	.190	1.743 (0.467 to 5.765)	.390
Variant (variant 1 v non-variant 1)	.046	0.350 (0.128 to 0.929)	.035

Les oncogènes drivers

les translocations ALK

- Valeur prédictive au crizotinib des différents variants de fusion ??

Others included:

Variant 3 (n = 1), variant 5 (n = 1),

Hétérogénéité de réponse aux ITK ALK
 Autres partenaires de fusion que EML4
 Variants d'EML4 v1 versus non-v1: pas de rationnel biologique
 Altérations génomiques concomitantes
 Etude rétrospective, faible n
 Contradictoire avec 2 autres études
 Quelle valeur pour des inhibiteurs de ALK de 2^{ème}/3^{ème} génération

Variable	Univariable Analysis, <i>P</i>	Multivariable Analysis	
		Hazard Ratio (95% CI)	<i>P</i>
Age (< v ≥ 70 years)	.339	—	—
Sex (male v female)	.128	0.936 (0.300 to 2.999)	.910
Performance status (0-1 v 2-3)	.032	0.727 (0.228 to 2.56)	.371
Smoking (yes v no)	.067	1.886 (0.538 to 6.743)	.322
Stage (IIIB, IV v postoperative recurrence)	.012	4.646 (1.381 to 21.750)	.009
Treatment line (first v nonfirst)	.155	0.591 (0.148 to 1.957)	.401
Brain metastasis (yes v no)	.190	1.743 (0.467 to 5.765)	.390
Variant (variant 1 v non-variant 1)	.046	0.350 (0.128 to 0.929)	.035

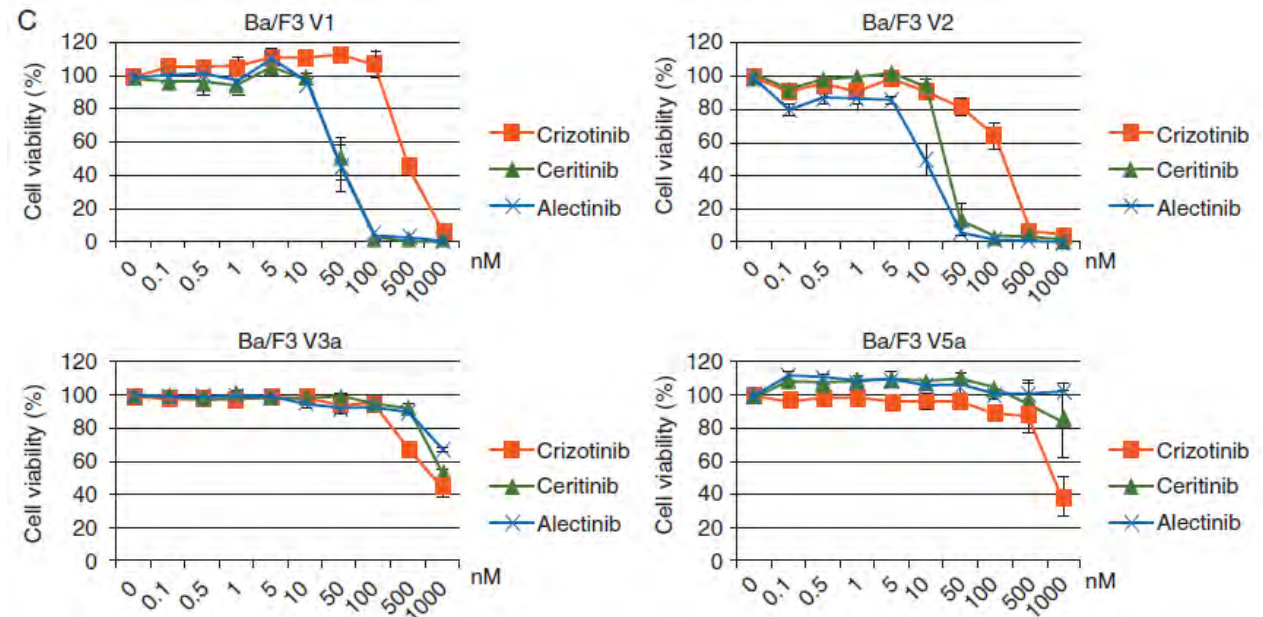
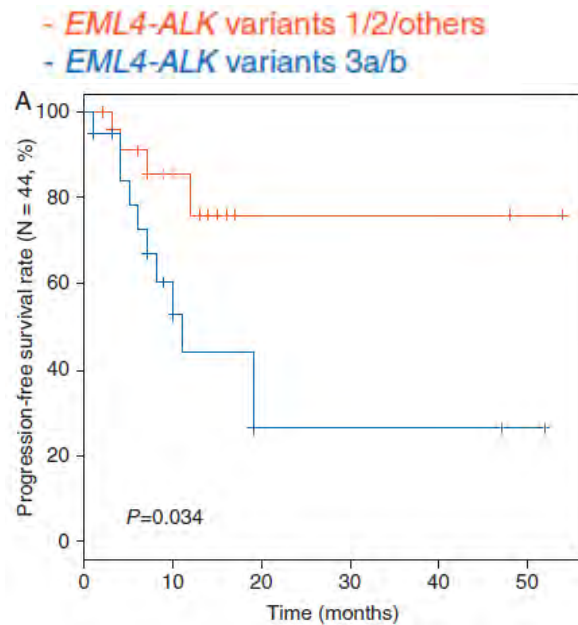
Les oncogènes drivers

les translocations ALK

Groups	Variants	N (%)
Variants 1/2/others	<i>EML4-ALK V1</i>	18 (33.3)
	<i>EML4-ALK V2</i>	6 (11.1)
	<i>EML4-ALK V7</i>	1 (1.8)
	<i>EML4-ALK unknown^a</i>	2 (3.7)
Variants 3a/b	<i>EML4-ALK V3a/b</i>	24 (44.4)
Other fusion partners		3 (5.6)
Total		54 (100)

RT-PCR

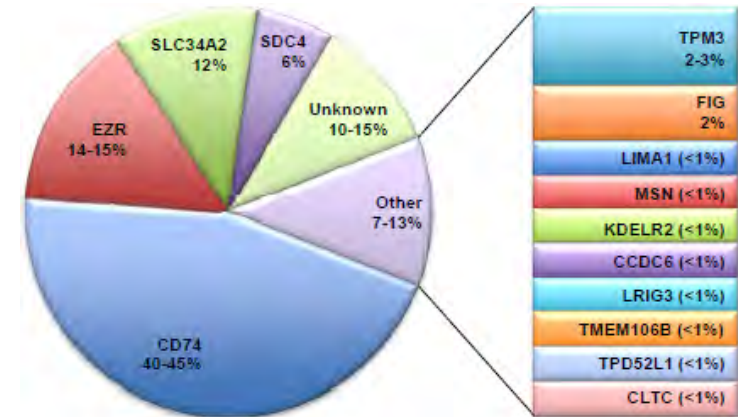
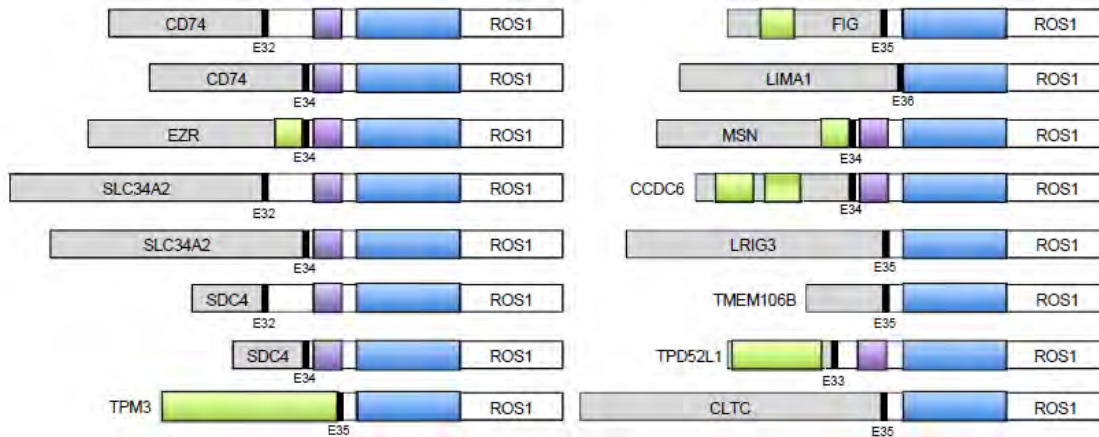
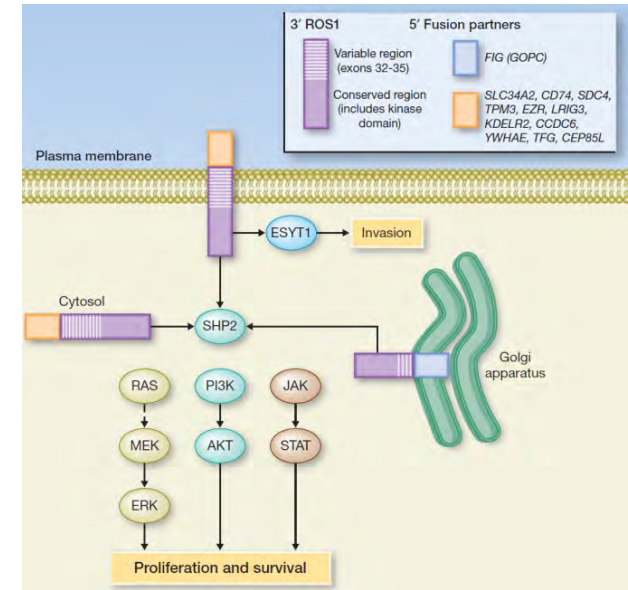
- Valeur prédictive négative des variants 3a/b (crizotinib, ceritinib, alectinib)



EML4-ALK variants	IC ₅₀ (nM)		
	Crizotinib	Ceritinib	Alectinib
Ba/F3 V1	471.2	48.16	42.55
Ba/F3 V2	268.8	28.34	14.99
Ba/F3 V3a	>500	>500	>500
Ba/F3 V5a	>500	>500	>500

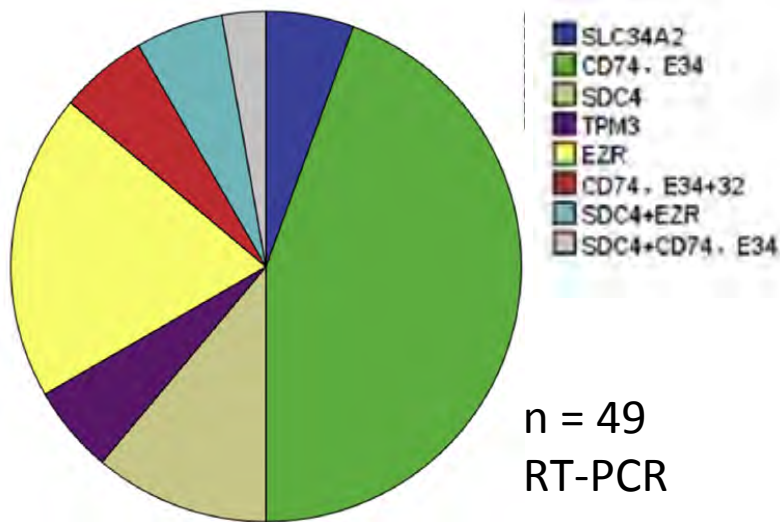
Translocations *ROS1*

- Chromosome 6q22
- Données cliniques: 1-2% (CBNPC) à 3% (Adk)
- Partenaires de fusion

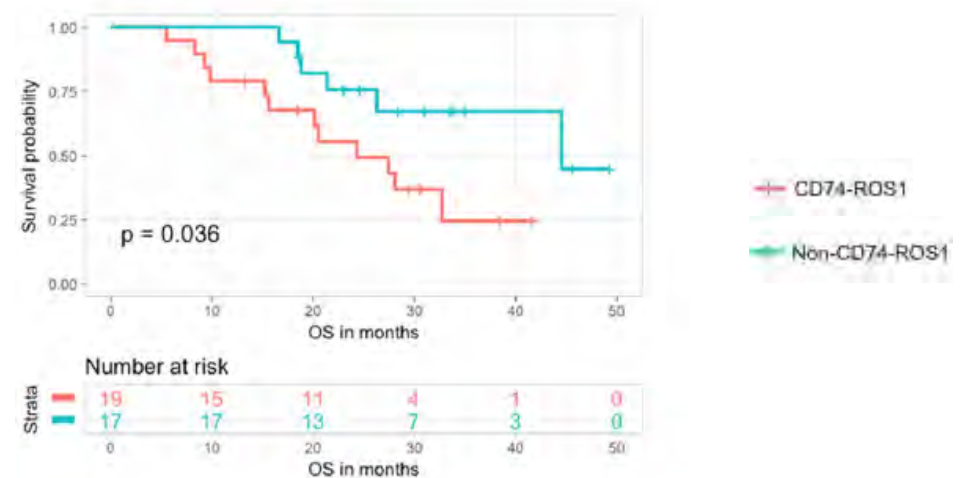
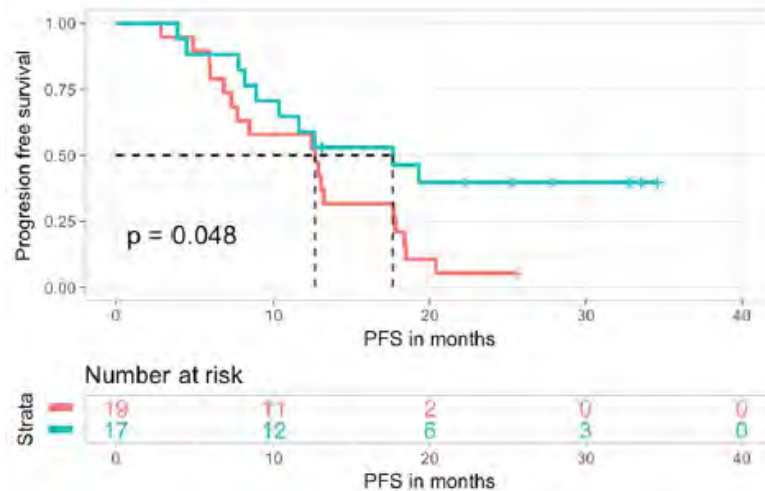


Translocations *ROS1*

- Efficacité du crizotinib en fonction des variants de *ROS1* ? (n= 49)

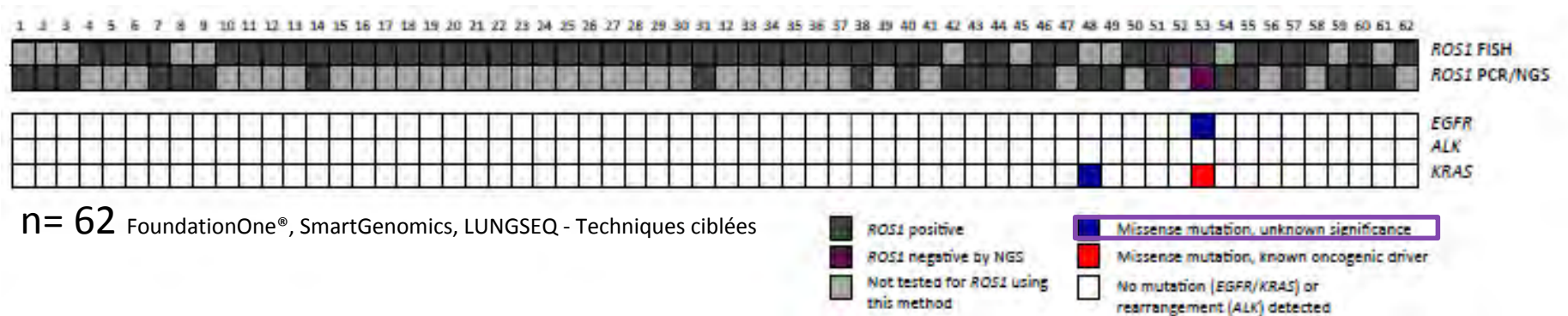


		ROS1 variants	N	%
CD74		CD74-E6; ROS1-E34	16	44.4
		CD74-E6; ROS1-E32/34	2	5.6
		SDC4-E2; ROS1-E32/CD74-E6; ROS1-E34	1	2.8
Non-CD74		SLC34A2-E14del; ROS1-E32	2	5.6
		SDC4-E2; ROS1-E32/EZR-E10; ROS1-E34	2	5.6
		TPM3-E8; ROS1-E35	2	5.6
		SDC4-E2; ROS1-E32	4	11.1
		EZR-E10; ROS1-E34	7	19.4
Total			36	100.0



Exclusivité des translocations avec mutations drivers ?

- Concomitance rare
- Translocation *ALK* + mutations *EGFR* : 0-8%
- Translocation *ROS1* + mutations : très rare ? 3-30% ...
 - Résistance primaire au crizotinib?



n = 25	9** (36%)
<i>EGFR</i>	6
<i>KRAS</i>	2
<i>PI3KCA</i>	1
<i>BRAF V600E</i>	1

** 5/9 avec cut-off à 15 (FISH): 13%

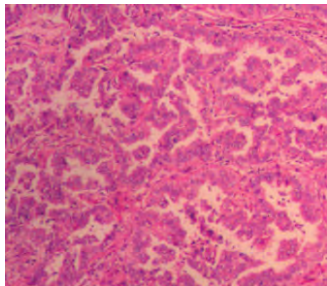
Sanger, panel Illumina 15gènes

Lin J, JTO 2017

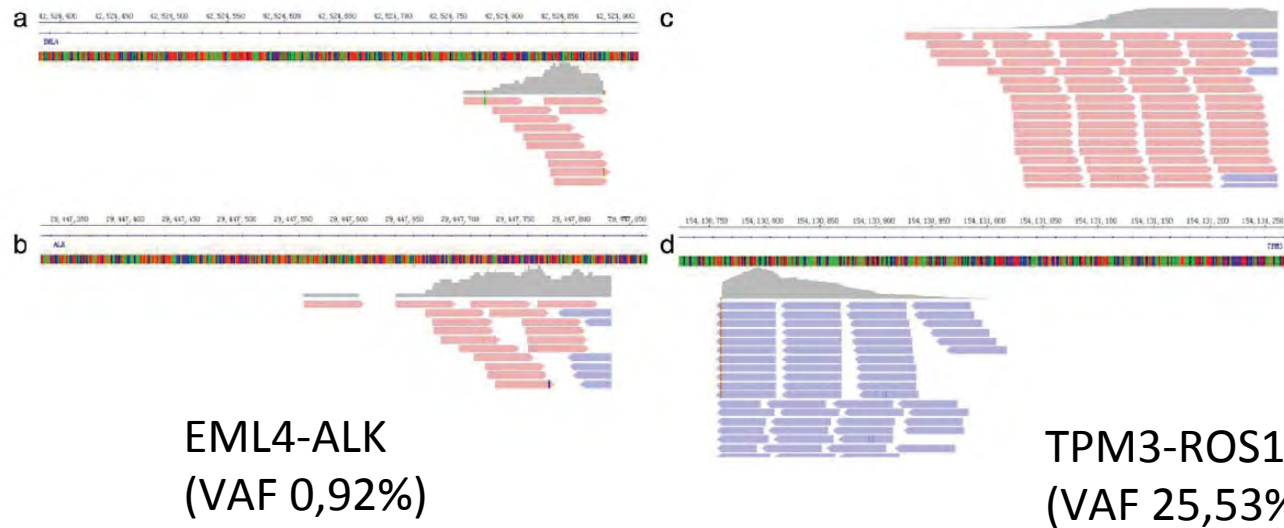
Wiesweg M, JTO2017

Exclusivité des translocations entre elles?

- Concomitance très rare
- Translocation *ALK-ROS1*: cas cliniques
 - 3 cas de translocation ALK-ROS1
 - Efficacité du crizotinib!



Adénocarcinome papillaire
IHC ALK -, IHC ROS1+



Analyse NGS

Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
HER2, cMETd14, KRAS

Recherche de translocations
ALK, ROS1
RET, NRG1, NTRK

Biopsie tissulaire

Si non réalisable/informatif:
biopsie liquide

Technique ciblée
NGS ciblé

Biopsie tissulaire

IHC
FISH
RT-PCR
NGS ciblé

Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
HER2, cMETd14, KRAS

Recherche de translocations
ALK, ROS1
RET, NRG1, NTRK

Biopsie tissulaire

Si non réalisable/informatif:
biopsie liquide

Technique ciblée
NGS ciblé

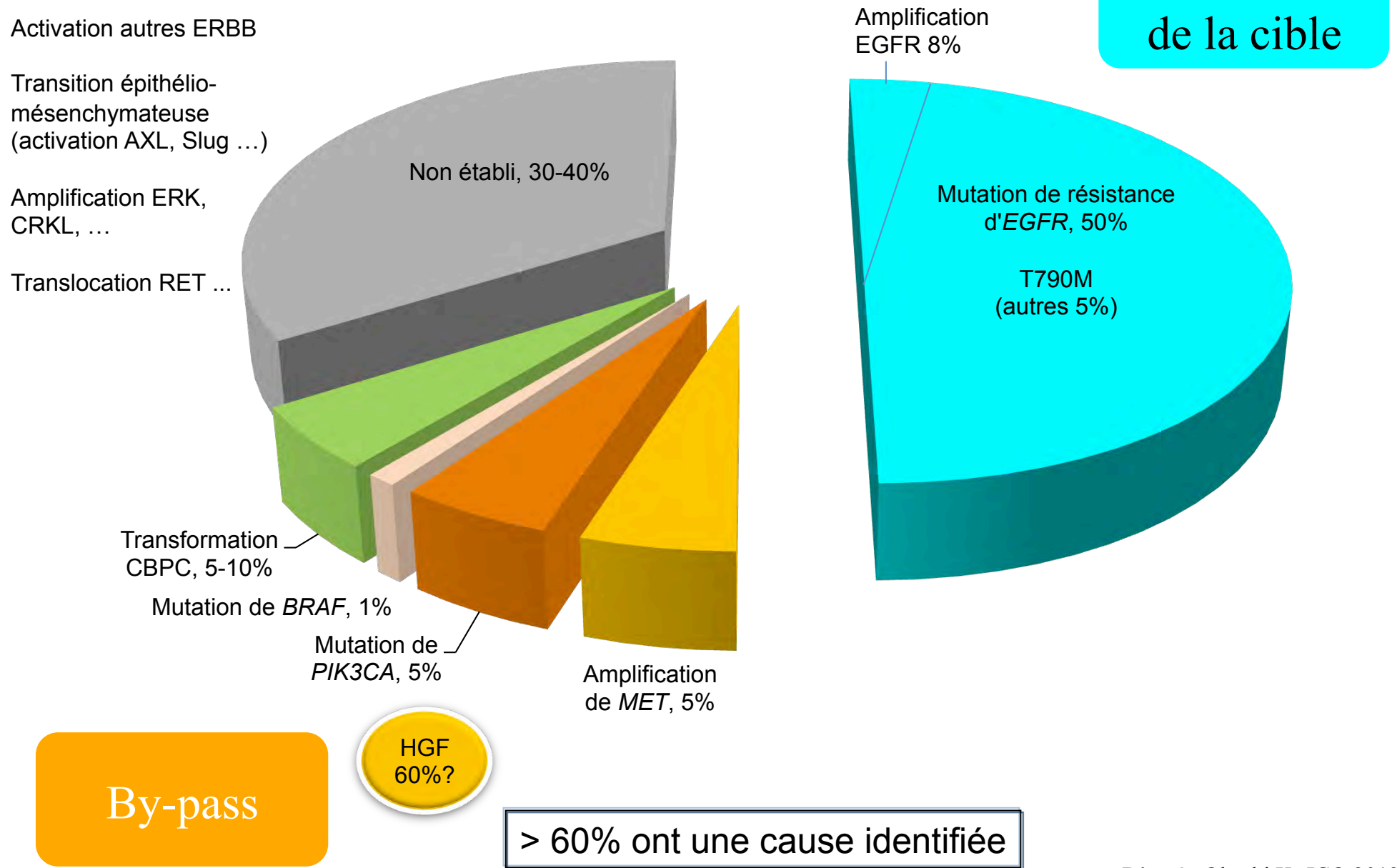
Biopsie tissulaire

IHC
FISH
RT-PCR
NGS ciblé

A la progression

ITK EGFR 1^{ère}/2^{ème} génération

Fréquence des mécanismes de résistance acquise aux ITK-EGFR des CBNPC mutés *EGFR*

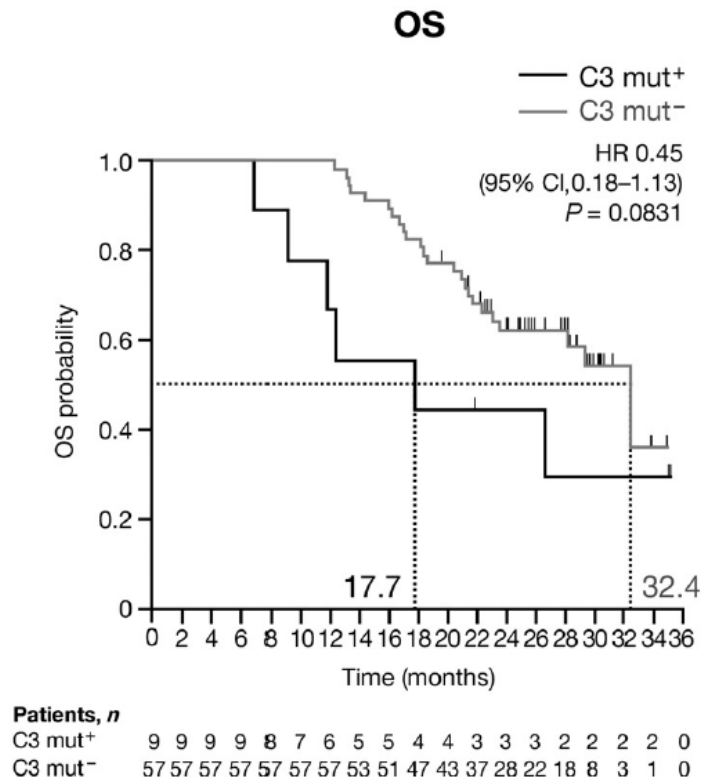


Les oncogènes drivers à la progression

ITK EGFR 1/2G

Biopsies liquides – EGFRm - monitoring

Etude FASTACT-2
Phase III erlotinib séquentiel
Cobas®



- Concordance tissu /plasma : 88%
- Sensibilité plasma: 75%
- Spécificité plasma: 96%
- Patients sous erlotinib: la persistance de la mutation activatrice à 3 mois est un facteur de mauvais pronostic



Modification tumeur primitive
ou sites métastatiques

Les oncogènes drivers à la progression

ITK EGFR 1/2G

Biopsies liquides - T790M

- 45% des patients ont une mutation T790M détectable AVANT la progression clinique
- Si résultat négatif:
 - *répéter le test
 - *technique plus sensible
 - *biopsie tissu

Platform	Patients	Alteration	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Concordance (%)
Cobas	24 patients with NSCLC treated with Nivolumab	T790M			61.4% positive agreement 78.6% negative agreement
ddPCR	60 patients progressing after EGFR TKI treatment	T790M	63	77	
BEAMing	Retrospective cohort of 216 patients from the AURA-1 study	T790M	69.0	70	–
BEAMing	23 patients progressing after a EGFR TKI	T790M	–	10 mutations detected	–
cobas	38 patients from the AURA 1 trial	T790M	100	41	57
ddPCR	38 patients from the AURA 1 trial	T790M	83	71	74
BEAMing	38 patients from the AURA 1 trial	T790M	67	71	70
cobas	72 patients from the AURA 1 trial	T790M	67	73	–
BEAMing	72 patients from the AURA 1 trial	T790M	58	81	–
cobas	226 patients from the AURA 3 trial	T790M	–	51	
ddPCR	208 patients from the AURA 3 trial	T790M	–	57	
NGS	227 patients from the AURA 3 trial	T790M	–	65%	
NGS	100 patients with NSCLC	T790M	T790M was identified in 4 tumor DNA samples and 8 ctDNA samples		
NGS	63 patients with cancer (51 were NSCLC and 48 were stage IIIB-IV)	T790M	100	90.5	97
qPCR	306 patients with NSCLC from AURA 17	T790M	–	49	
cobas	306 patients with NSCLC from AURA 17	T790M	–	42	
ddPCR	306 patients with NSCLC from AURA 17	T790M	–	56	
NGS	48 patients with NSCLC	T790M	A comparison was not present; this mutation was detected in 50% of the patients		

Les oncogènes drivers à la progression

ITK EGFR 1/2G

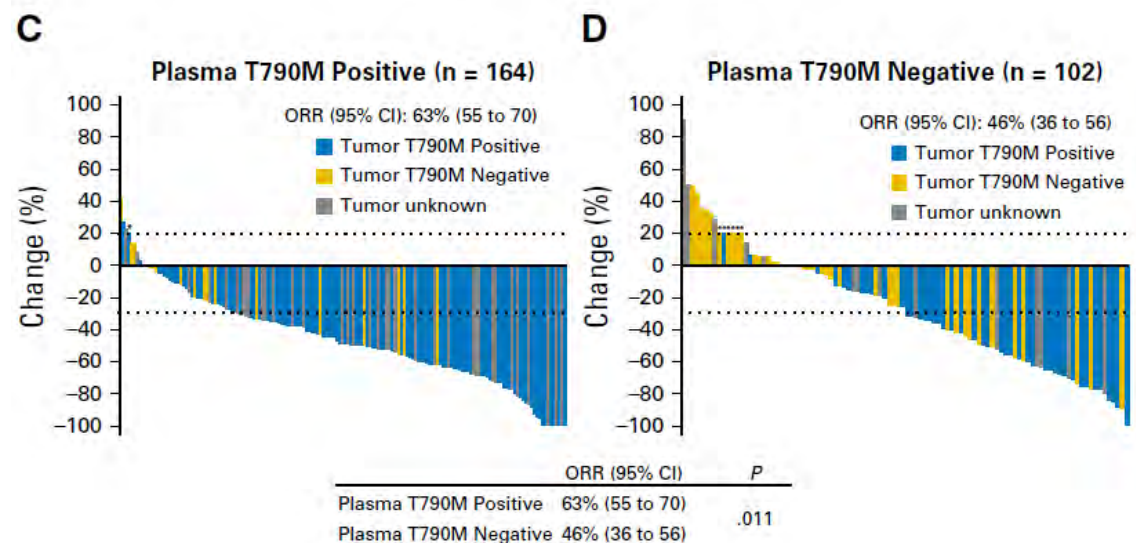
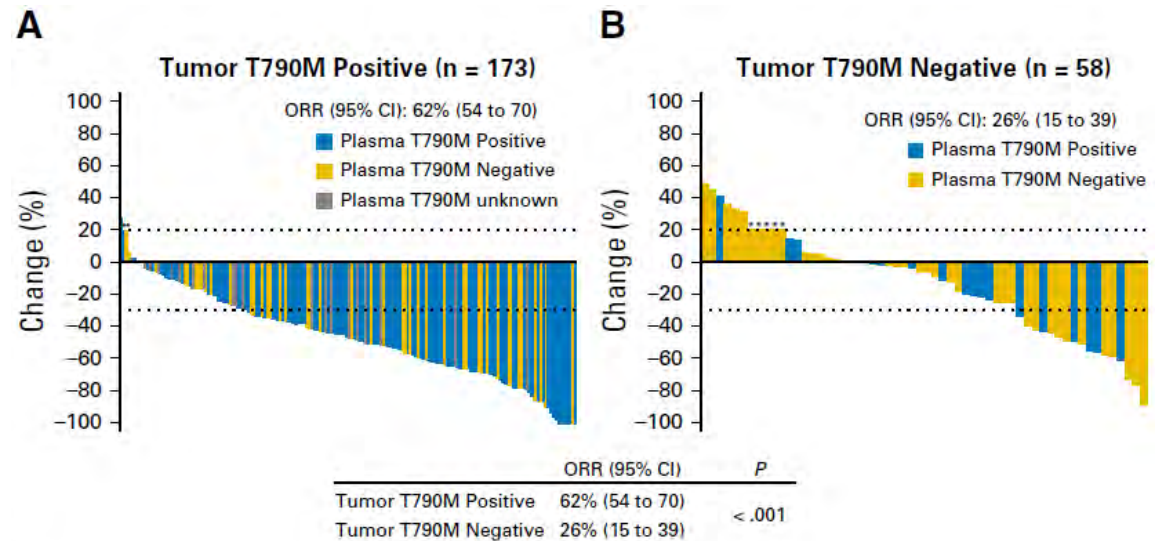
Biopsies liquides - T790M

- 45% des patients ont une mutation T790M détectable avant la progression clinique
- Si résultat négatif:
 - *répéter le test
 - *technique plus sensible
 - *biopsie tissu

Platform	Patients	Alteration	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Concordance (%)
Cobas	24 patients with NSCLC treated with Nivolumab	T790M			61.4% positive agreement 78.6% negative agreement
ddPCR	60 patients progressing after EGFR TKI treatment	T790M	63	77	
BEAMing	Retrospective cohort of 216	T790M	69.0	70	–
BEAMing	<p>Un test plasmatique T790M négatif a d'autant plus de valeur que la mutation activatrice de l'EGFR est détectée</p> <p>Mais</p> <p>Fréquence allélique de la T790M plus faible que la pour la mutation activatrice initiale</p>				
cobas					
ddPCR					
BEAMing					
cobas					
BEAMing					
cobas					
ddPCR					
NGS					
NGS					
NGS					
qPCR					
cobas	306 patients with NSCLC from AURA 17	T790M	–	42	
ddPCR	306 patients with NSCLC from AURA 17	T790M	–	56	
NGS	48 patients with NSCLC	T790M	A comparison was not present; this mutation was detected in 50% of the patients		

Les oncogènes drivers à la progression ITK EGFR 1/2G T790M

- AURA, Phase I, (n=216)
- Osimertinib > L1
- Tumeur ET plasma Statut à la progression sous ITK 1G
- Techniques: BEAMing dPCR < Cobas® ou ddPCR
- T790M et détection dans le plasma
 - Sensibilité 70%
 - 31% de détection plasma seul

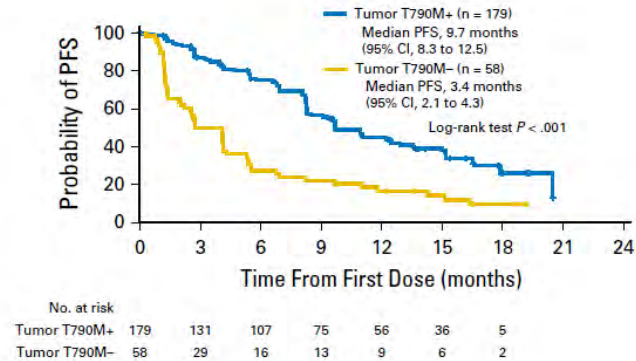


Les oncogènes drivers à la progression ITK EGFR 1/2G T790M

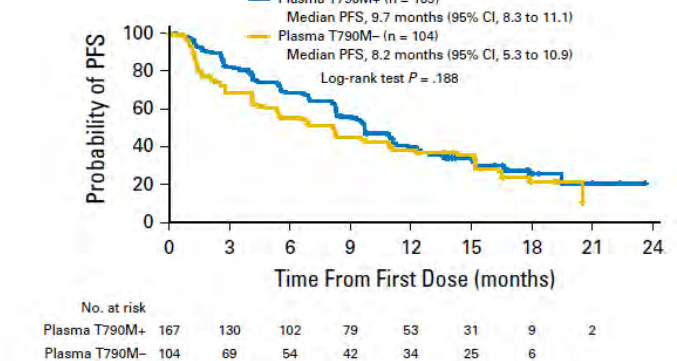
- Phase I, AURA (n=216)

T790M	PFSm (mois)
Plasma	9,7
Tumeur	9,7
Tumeur seule	16,5
Tumeur et plasma	9,3
Négatif tumeur et plasma	2,8

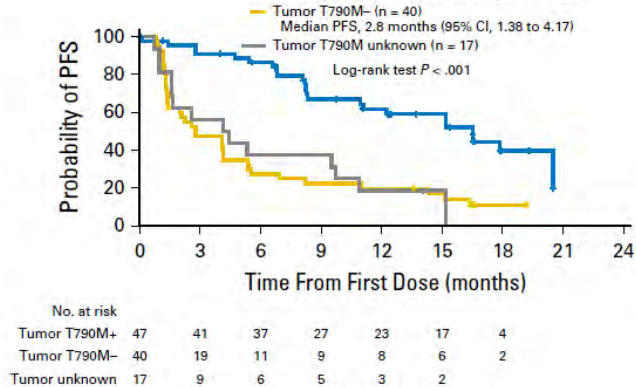
Tumor T790M



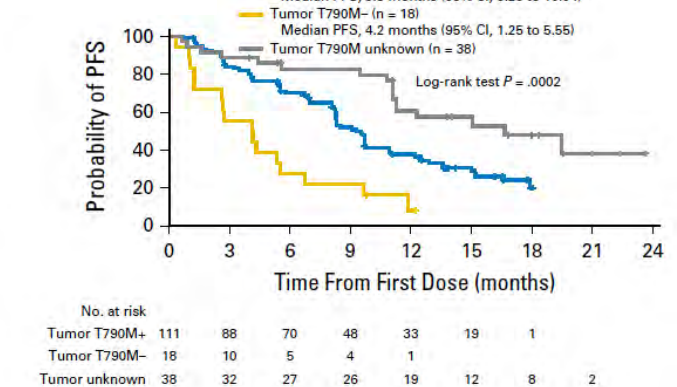
Plasma T790M



Plasma T790M -



Plasma T790M +



Oxnard GR, JCO 2016

- La « clearance » des mutations (del19/L858R , T790M) dans le plasma à 6 semaines sous osimertinib est corrélée à une meilleure réponse et un meilleur pronostic -> monitoring plasmatique

Thress KS, JCO 2017

Les oncogènes drivers à la progression *ITK EGFR 1^{ère}/2^{ème} génération*

- 5 patients avec résistance primaire à osimertinib
- Transformation CBPC
- Analyse plasmatique avant traitement
 - Faible ratio T790M/mutation activatrice
 - T790M négative avec technique ciblée classique / T790M positive avec ddPCR

Patient	Histology	Site of diagnostic biopsy	1 st line EGFR TKI							Ratio T790M/activating	2 nd line EGFR TKI - osimertinib							
			EGFR baseline mutation	1 st line EGFR TKI	Best response	Overall 1 st line PFS (months)	Tissue re-biopsy	Re-biopsy histology	cfDNA (copies/mL) [AF]		cfDNA thera-screen	Best response	Overall 2 nd line PFS (months)	Tissue re-biopsy	Re-biopsy histology	cfDNA (copies/mL) [AF]	cfDNA thera-screen	Other anti cancer therapy
1	ADK	primary	ex19del	Afatinib	PR	10	-	-	ex19del+ (3390000) [88.82%] T790M+ (5200)[2.3%]	0.026	-	PD	3	primary	SCLC ex19del-T790M-	-	-	-
2	ADK	pleura	ex19del	Afatinib	PR	9	-	-	ex19del+ (44400) [15.8%] T790M+ (110)[0.07%]	0.004	-	PD	2	liver	SCLC ex19del+ T790M-	-	-	-
3	ADK	primary	L858R	Afatinib	PR	22 ^a	pancreas	ADK L858R+ T790M+ + SCLC L858R+ T790M-	L858R+ (56000) [43.90%] T790M+ (340)[0.26%]	0.006	L858R+ (DCt: 2.08) T790M-	PD	1	-	-	-	-	
4	ADK	lymph node	ex19del	Gefitinib	PR	25 ^b	-	-	ex19del+ (2400) [10%] T790M+ (90)[0.2%]	0.02	ex19del+ (DCt: 5.12) T790M-	PD	3	liver lung	SCLC ex19del-T790M- SCLC ex19del+ T790M-	ex19del (17000) [21.60%] T790M-	ex19del+ (DCt: 3.82) T790M-	✓
5	ADK	primary	L858R	Afatinib	PR	15	-	-	L858R+ (12500) [20%] T790M+ (90)[0.16%]	0.008	L858R+ (DCt: 3.39) T790M-	PD	3	adrenal gland	SCLC L858R+ T790M-	L858R+ (405000) [81.40%] T790M-	L858R+ (DCt: 1.46) T790M-	✓

Les oncogènes drivers à la progression

ITK EGFR 1^{ère}/2^{ème} génération

Altération moléculaire	ITK	Mécanisme de résistance	Biopsie tissulaire	Biopsie liquide
Mutations activatrices EGFR	ITK-EGFR 1 ^{ère} ou 2 ^{ème} génération (erlotinib, gefitinib, (afatinib)	Mutation EGFR > 50% : T790M	+++	++++
		Amplification EGFR	+++	+++
		Activation de voies de signalisation alternatives :		
		Amplification MET, HER2	+++	+++
		Activation AXL	++	-
Expression HGF	+++	-		
		Transformation phénotypique (CBPC, EMT, ...)	+++	-

Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
HER2, cMETd14, KRAS

Recherche de translocations
ALK, ROS1
RET, NRG1, NTRK

Biopsie tissulaire

Si non réalisable/informatif:
biopsie liquide

Technique ciblée
NGS ciblé

Biopsie tissulaire

IHC
FISH
RT-PCR
NGS ciblé

A la progression

ITK EGFR 1^{ère}/2^{ème} génération

Recherche de mutation de résistance EGFR, T790M

Biopsie liquide

Si négatif: biopsie tissulaire
Répéter biopsie liquide

Technique ciblée
PCR digitale

Histologie

Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
HER2, cMETd14, KRAS

Recherche de translocations
ALK, ROS1
RET, NRG1, NTRK

Biopsie tissulaire

Si non réalisable/informatif:
biopsie liquide

Technique ciblée
NGS ciblé

Biopsie tissulaire

IHC
FISH
RT-PCR
NGS ciblé

A la progression

ITK EGFR 1^{ère}/2^{ème} génération

Recherche de mutation de résistance EGFR, T790M

Biopsie liquide

Si négatif: biopsie tissulaire
Répéter biopsie liquide

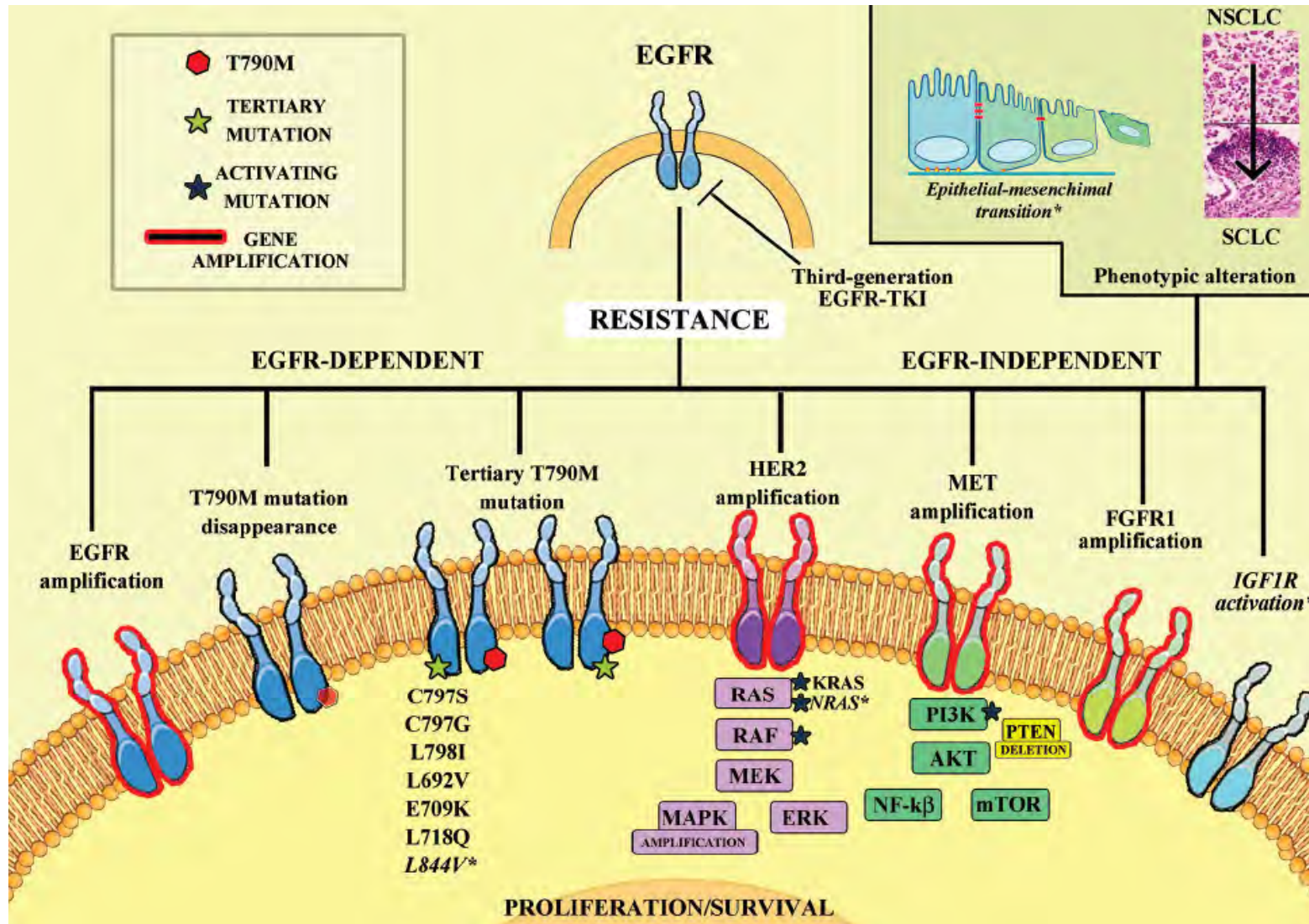
Technique ciblée
PCR digitale

Histologie

A la progression

ITK EGFR 3^{ème} génération

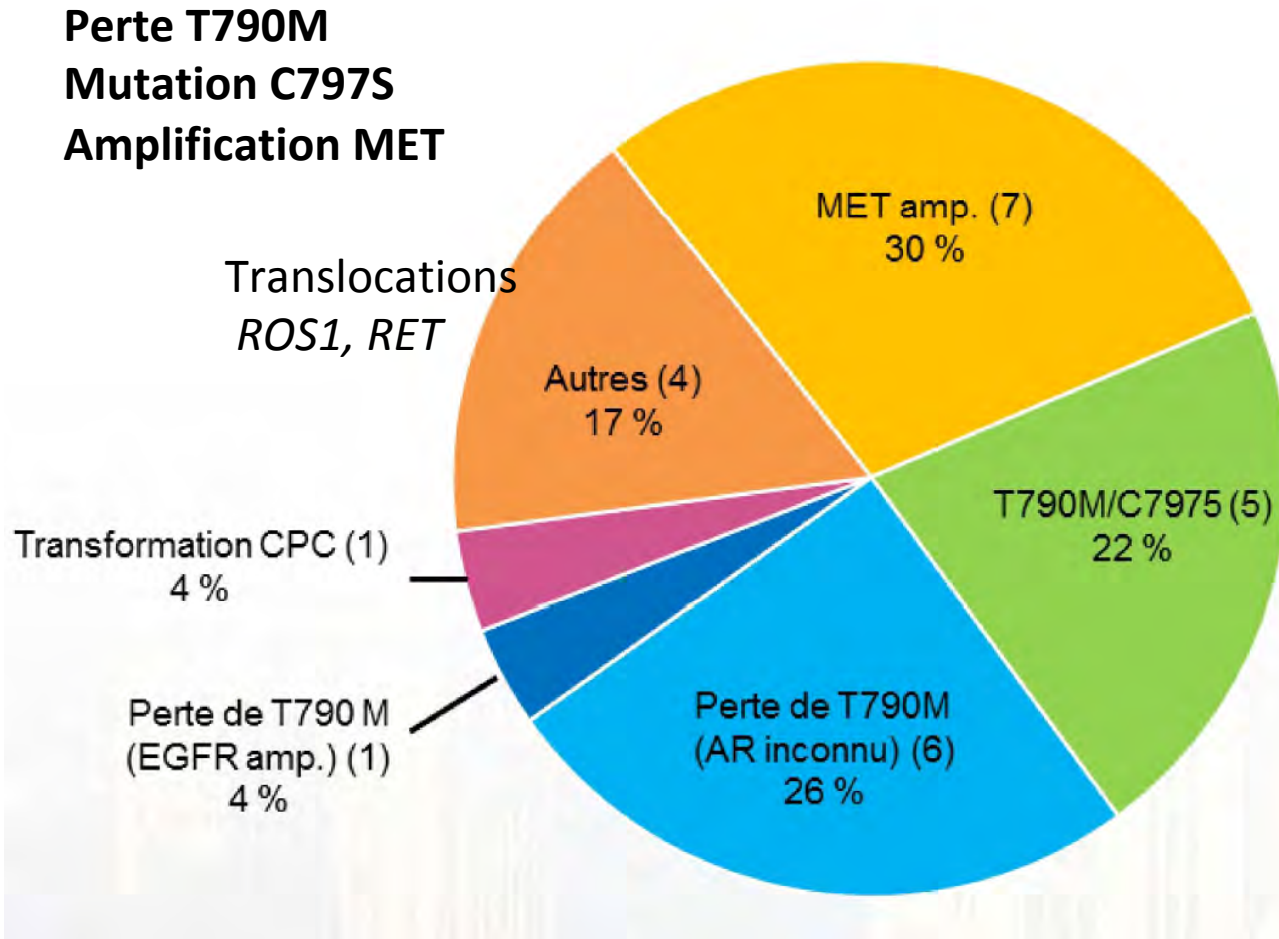
Les oncogènes drivers à la progression ITK EGFR 3^{ème} génération



Les oncogènes drivers à la progression *ITK EGFR 3^{ème} génération*

Résistance dépendante ou non d'EGFR

- Réactivation voie EGFR
 - Mutation C797S
- Voies alternatives
- Faible dépendance EGFR

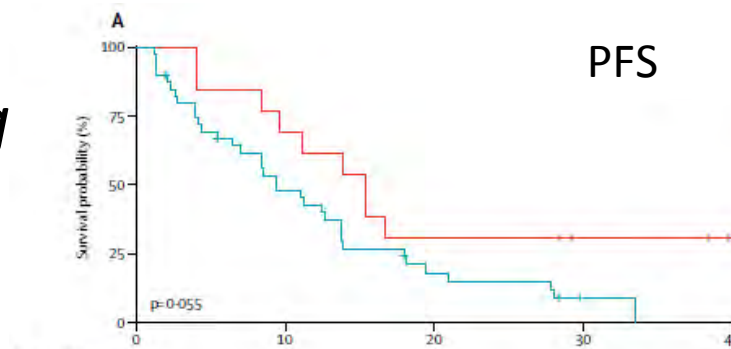


Les oncogènes drivers à la progression

ITK EGFR 1/2G

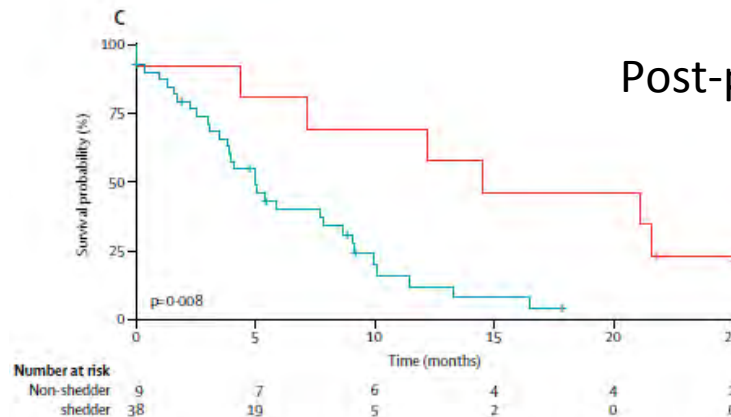
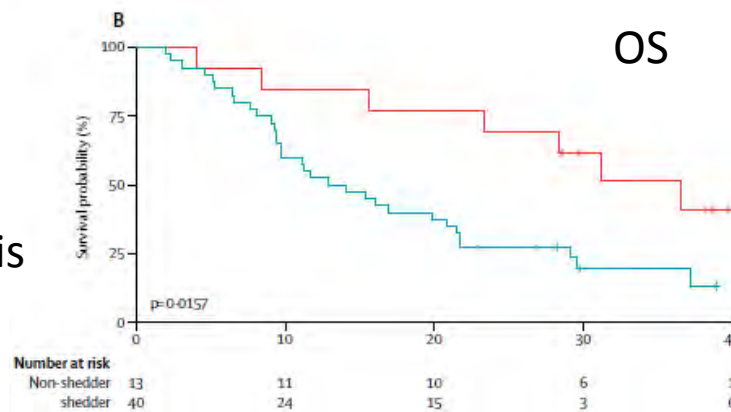
T790M- monitoring

- AURA, phase I, II (n=53)
- Osimertinib > L1
- mFS 11 mois, mOS 16,9 mois
- **Statut avant traitement**
- La présence de mutations dans le plasma est de mauvais pronostic



— Aucune mutation n=13

— Mutation activatrice n=40
Dont n=34 (85%) avec T790M

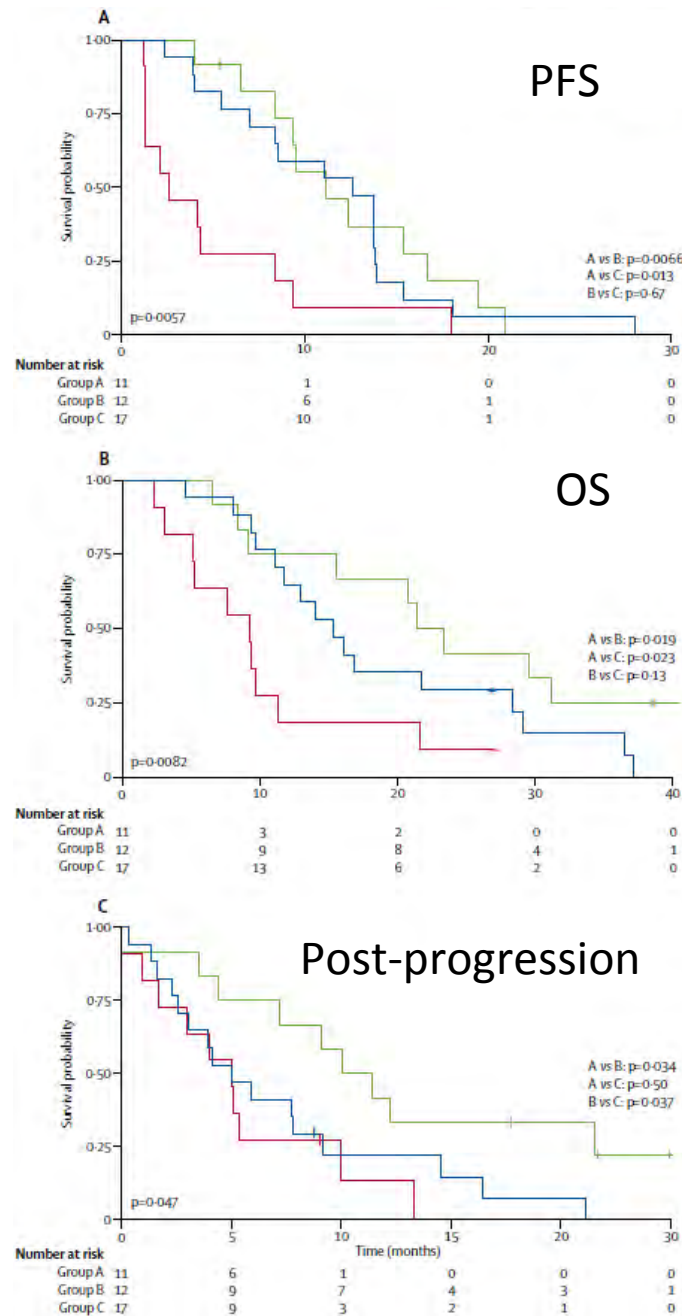


Les oncogènes drivers à la progression

ITK EGFR 1/2G

T790M- monitoring

- AURA, phase I, II (n=53)
- Osimertinib >L1
- Statut à la progression sous osimertinib
- La perte de la mutation T790M est de mauvais pronostic
- La présence de mutation activatrice est mauvais pronostic
- La mutation C797S est de bon pronostic



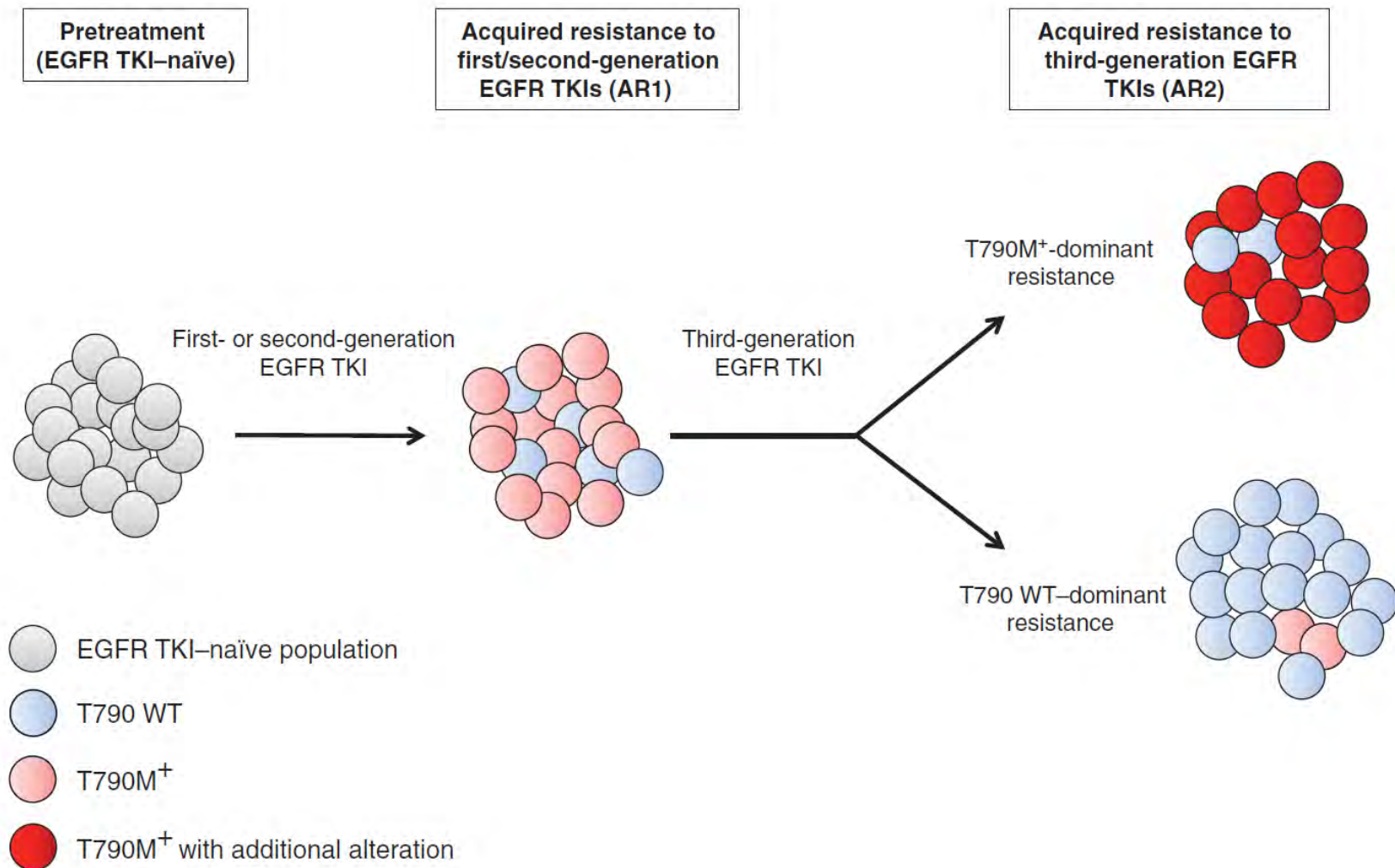
— Perte de T790M et présence mutation activatrice n=11 (A)

— Présence de mutations n=12 (C)

— Absence de mutation n=12 (B)

Les oncogènes drivers à la progression *ITK EGFR 3^{ème} génération*

Perte de la T790M

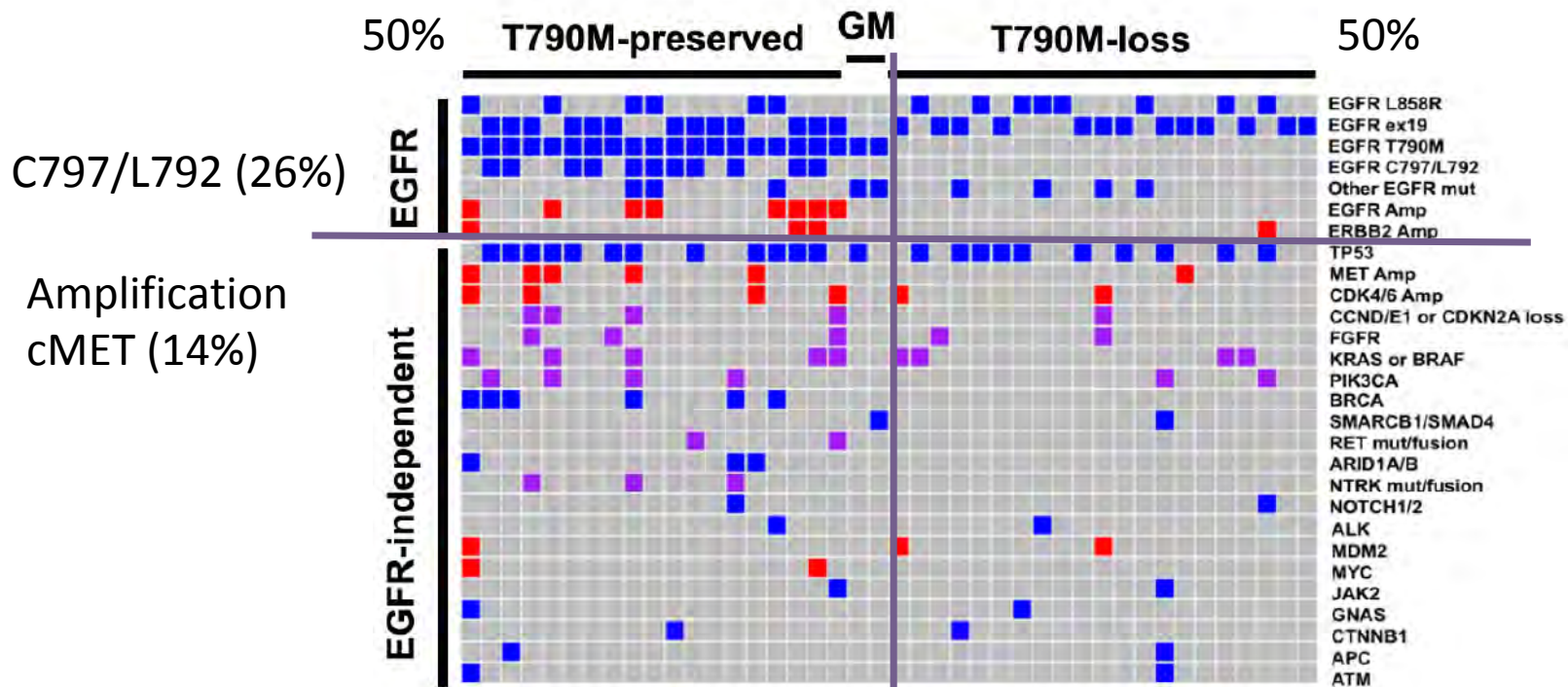


Les oncogènes drivers à la progression

ITK EGFR 3G

Mécanismes EGFR indépendants

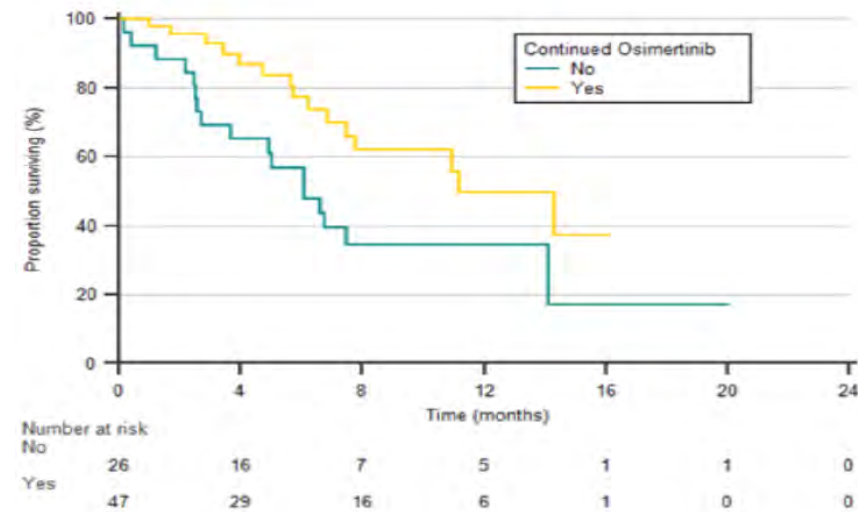
- Osimertinib n= 118
- L1 (n=6) et > L1



Les oncogènes drivers à la progression

ITK EGFR 3G

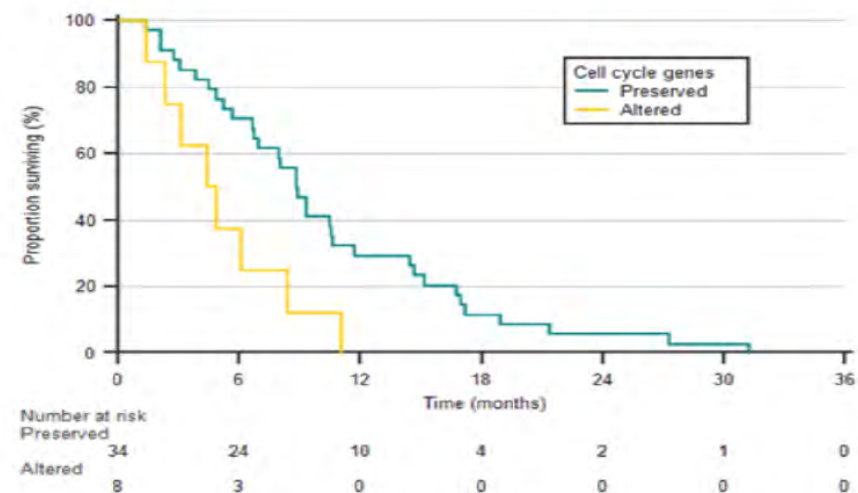
- Osimertinib n= 118
- L1 (n=6) et > L1
- Poursuite de l'osimertinib à progression ont un meilleur pronostic



- Analyse moléculaire à progression n=42

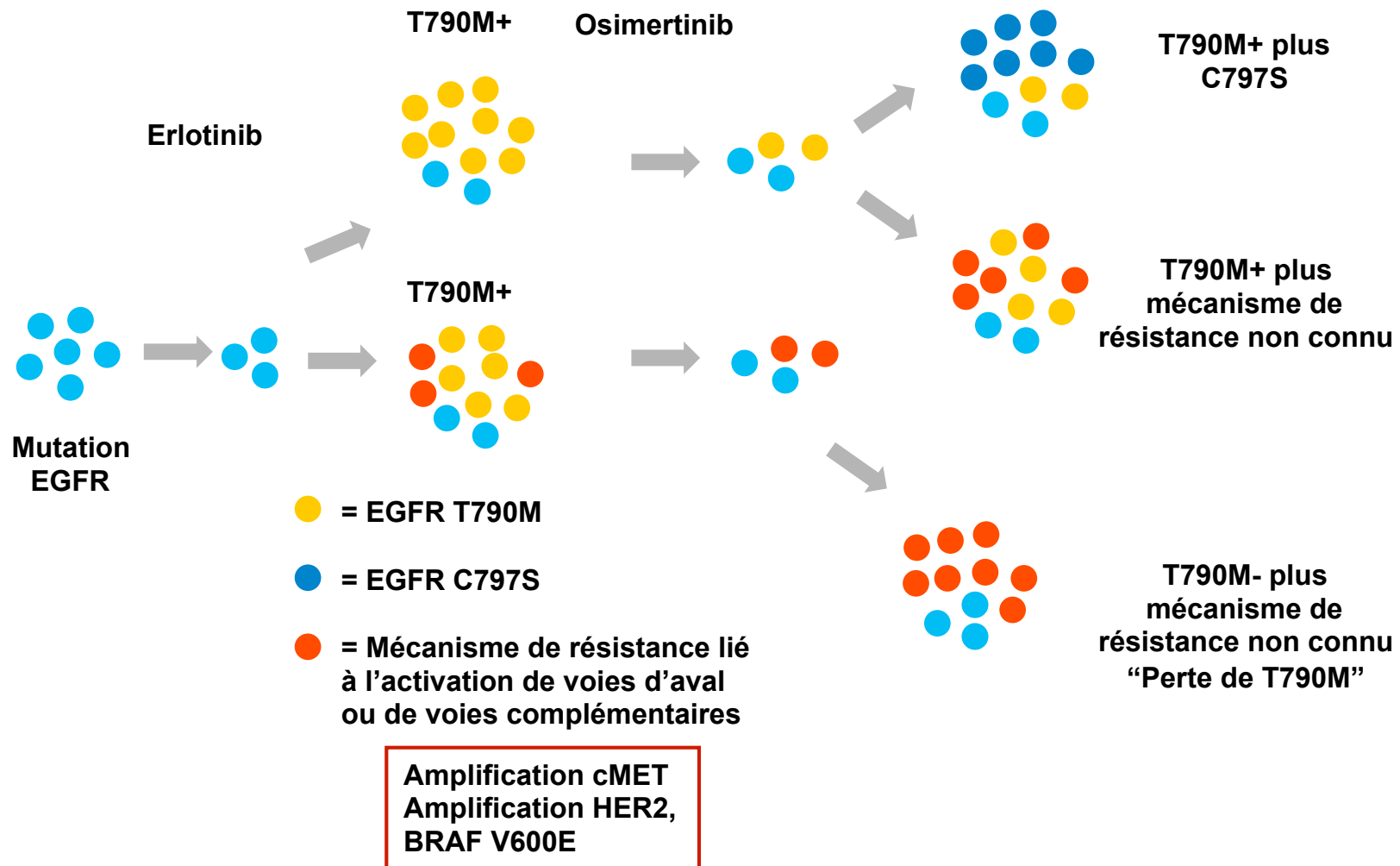
Facteurs de mauvais pronostic

- Altérations de gènes du cycle cellulaire (amplification CDK4/6, perte de CDKN2A)



Les oncogènes drivers à la progression

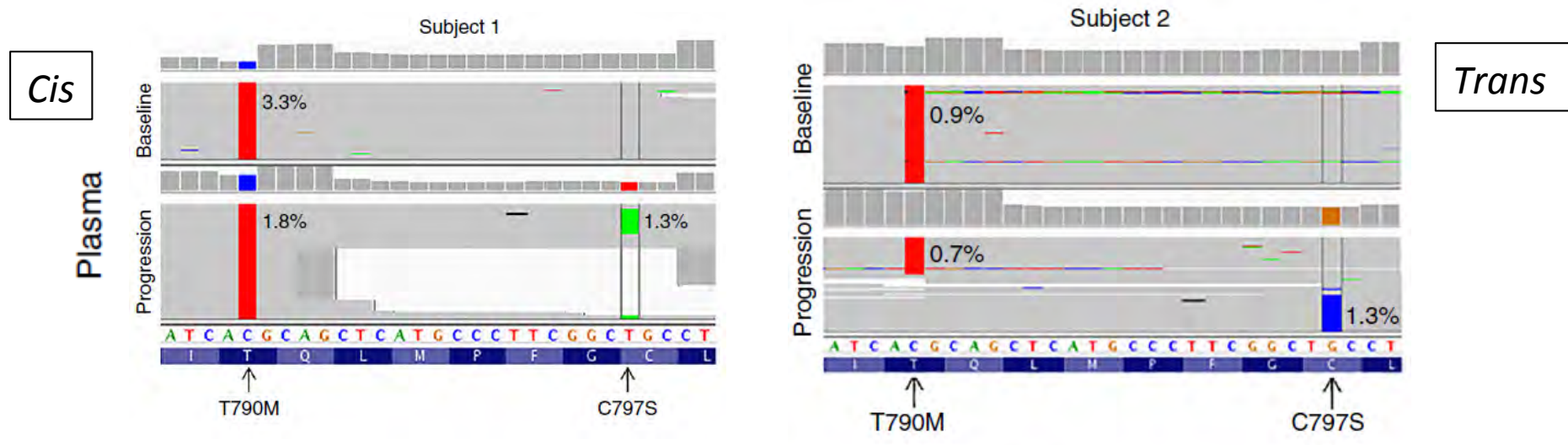
ITK EGFR 3^{ème} génération



Les oncogènes drivers à la progression

ITK EGFR 3^{ème} génération

- Mutation *EGFR* C797S (exon 20) dans plasma
- 22% des résistances secondaires à l'osimertinib en 2^{ème} ligne (n=15)
 - En *cis* ou *trans*

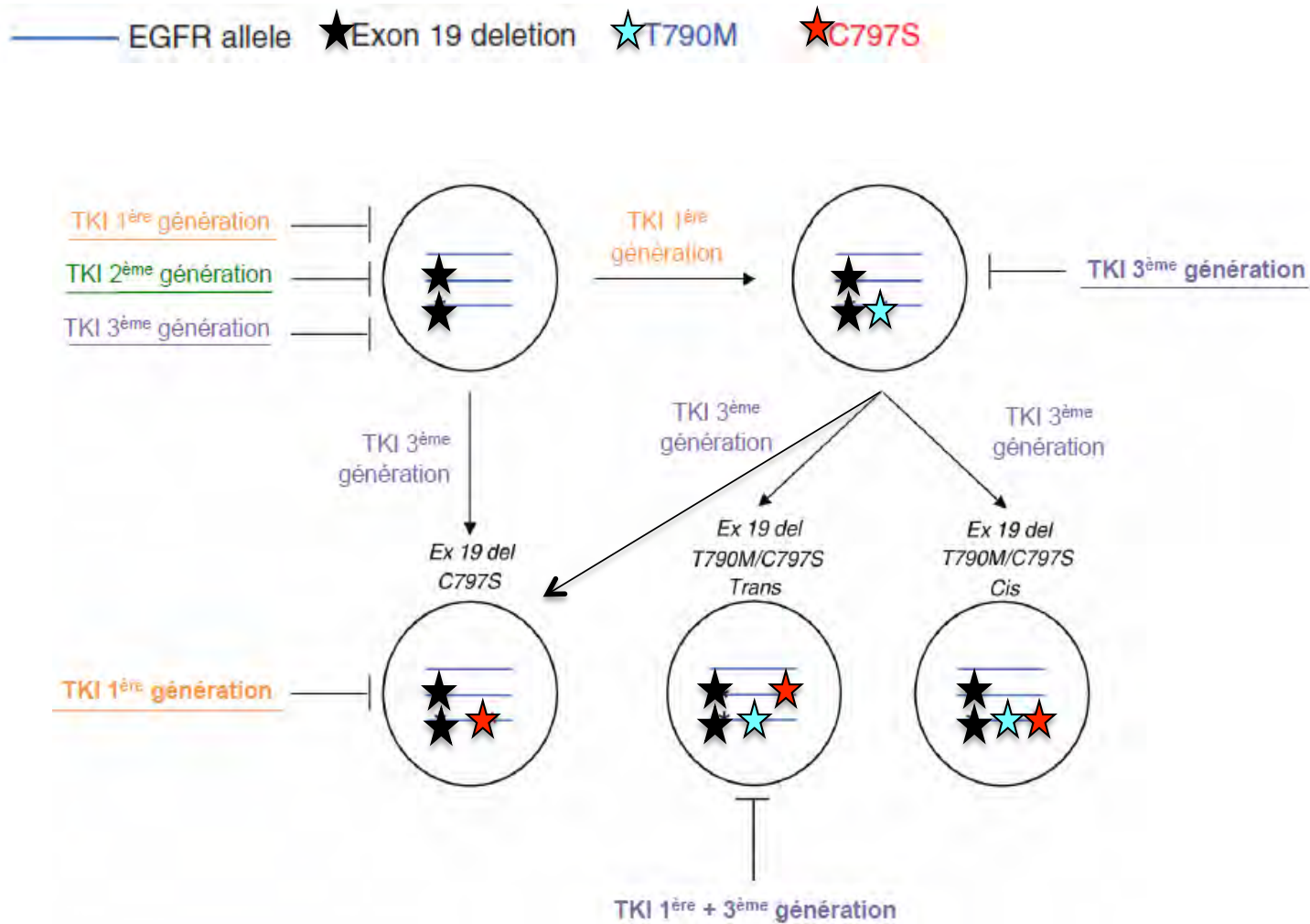


-> intérêt du monitoring plasma

- Mutation *EGFR* C797S après osimertinib en 1^{ère} ligne, sans T790M -> monitoring plasmatique

Résistances aux inhibiteurs de T790M dépendantes d'EGFR

Mutation « tertiaire » C797S: 30-40%
Valeur prédictive?



Les oncogènes drivers à la progression

ITK EGFR 3^{ème} génération

- Pas de consensus actuellement sur la recherche de biomarqueur lors de la progression sous ITK-EGFR 3G
- C797S en trans: triples mutants *EGFR*_m/T790M/C797S
- Disparition de la T790M
- Translocations
- Transformation histologique
- Quid des profils de résistance en 1^{ère} ligne ?

Les oncogènes drivers à la progression

ITK EGFR 3^{ème} génération

Altération moléculaire	ITK	Mécanisme de résistance	Biopsie tissulaire	Biopsie liquide
Mutations EGFR après T790M	ITK-EGFR 3 ^{ème} génération (osimertinib)	Mutations EGFR: C797S/G, L798I, L692V, E709K, L718Q, L844V ...	+++	+++
		Disparition de la T790M	+++	++++
		Amplification EGFR	+++	+++
		Activation de voies de signalisation alternatives		
		Amplification HER2, MET, FGFR1	+++	+++
		Autres mutations : BRAF, NRAS, Rb, PIK3CA	+++	+++
		Activation IGF1R, ERK	++	-
Translocation ROS1	+++	-		
		Transformation phénotypique (CBPC, EMT, ...)	+++	-

Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
HER2, cMETd14, KRAS

Recherche de translocations
ALK, ROS1
RET, NRG1, NTRK

Biopsie tissulaire

Si non réalisable/informatif:
biopsie liquide

Technique ciblée
NGS ciblé

Biopsie tissulaire

IHC
FISH
RT-PCR
NGS ciblé

A la progression

ITK EGFR 1^{ère}/2^{ème} génération

Recherche de mutation de résistance EGFR, T790M

Biopsie liquide

Si négatif: biopsie tissulaire
Répéter biopsie liquide

Technique ciblée
PCR digitale

Histologie

A la progression

ITK EGFR 3^{ème} génération

Recherche de mutation de résistance EGFR: C797S, L718Q, L844V ...
Perte de la mutation EGFR T790M

Biopsie liquide

Si négatif: biopsie tissulaire
Répéter biopsie liquide

Technique ciblée
PCR digitale
NGS ciblé

Histologie

Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
HER2, cMETd14, KRAS

Recherche de translocations
ALK, ROS1
RET, NRG1, NTRK

Biopsie tissulaire

Si non réalisable/informatif:
biopsie liquide

Technique ciblée
NGS ciblé

Biopsie tissulaire

IHC
FISH
RT-PCR
NGS ciblé

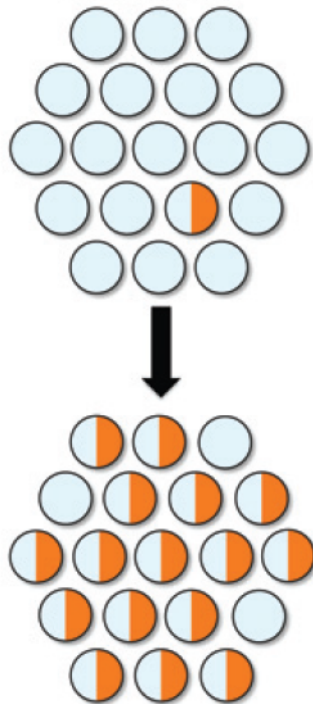
A la progression

ITK ALK 1^{ère}/2^{ème}/3^{ème} génération

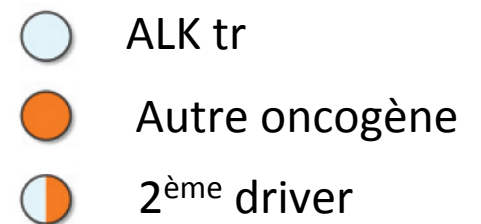
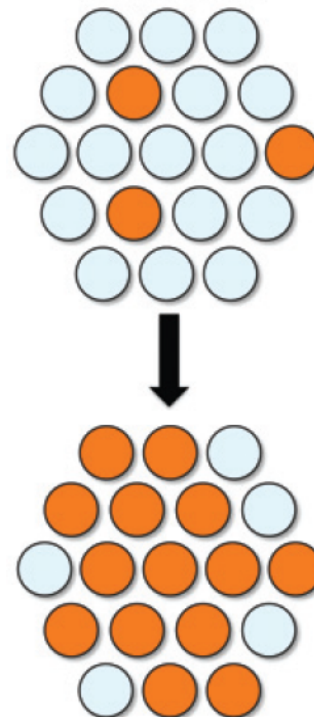
Les oncogènes drivers à la progression *ITK ALK 1^{er}/2^{ème} génération*

- Dépendants ou non d'ALK
- **Conservation ou non de la translocation**

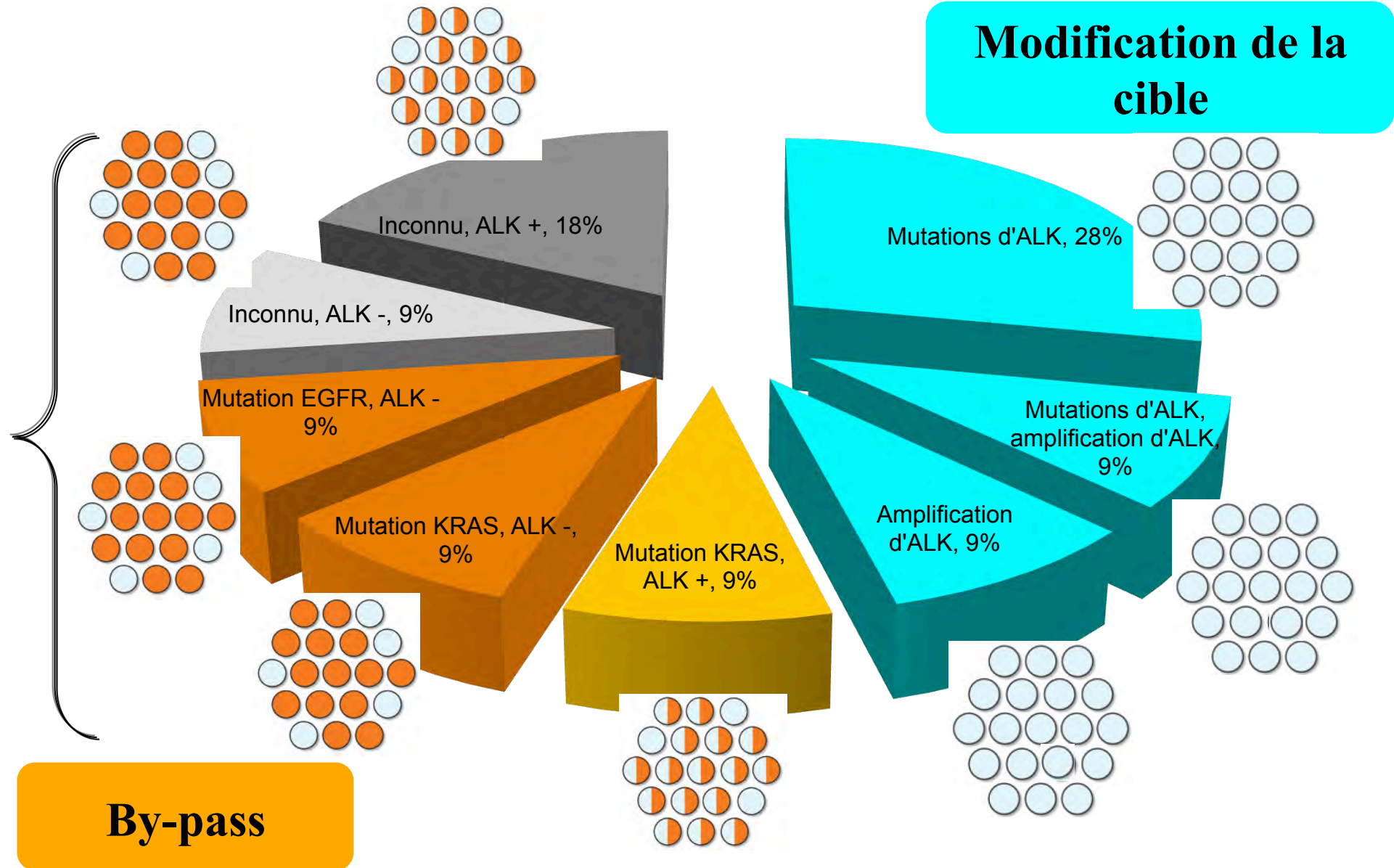
Emergence d'un 2^{ème} driver



Emergence d'un autre driver

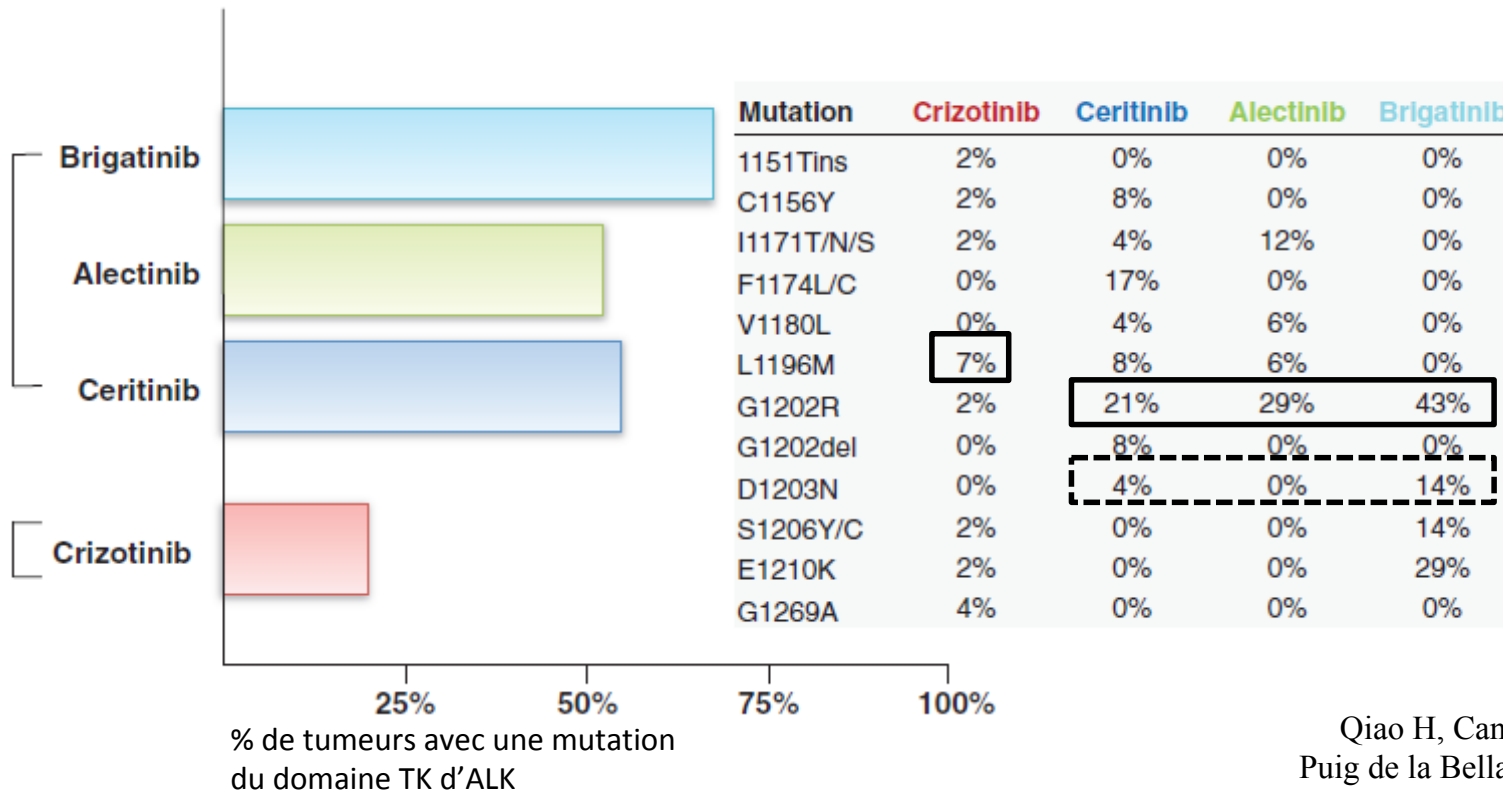
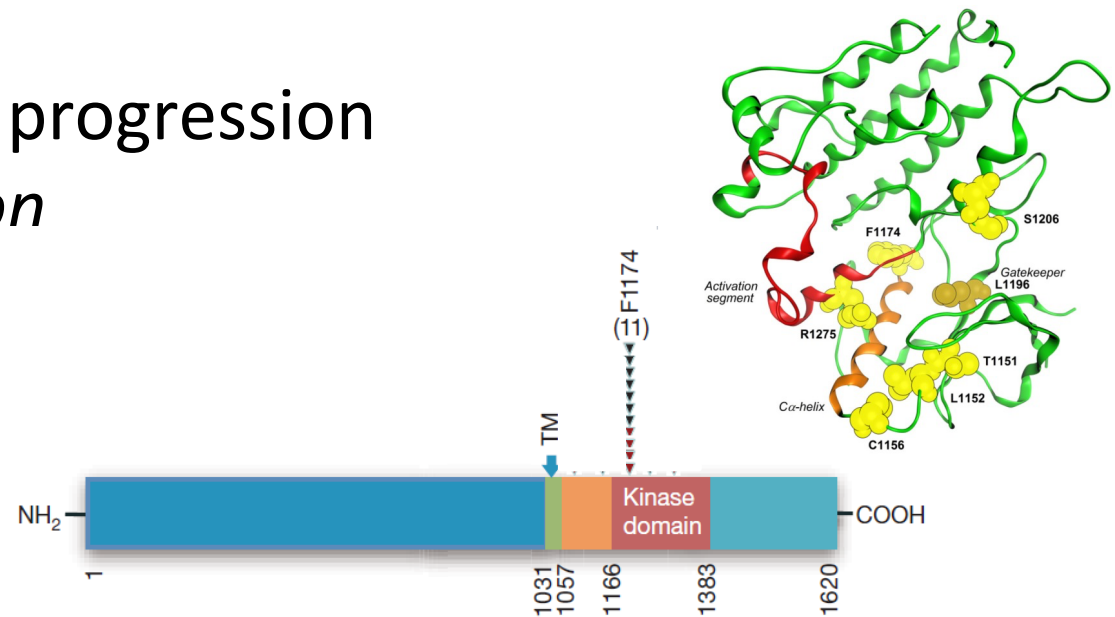


Les oncogènes drivers à la progression *ITK ALK 1^{ère}/2^{ème} génération*



Les oncogènes drivers à la progression *ITK ALK 1^{ère}/2^{ème} génération*

- Les mutations d'ALK
 - Fréquentes : 20 à > 50%
 - Domaine TK : exons 20-28
 - Non récurrentes



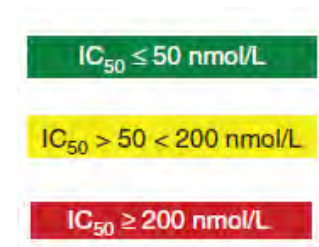
Les oncogènes drivers à la progression

ITK ALK 1^{ère}/2^{ème} génération

- Les mutations d'ALK
 - Quelle valeur prédictive aux ITK-ALK?

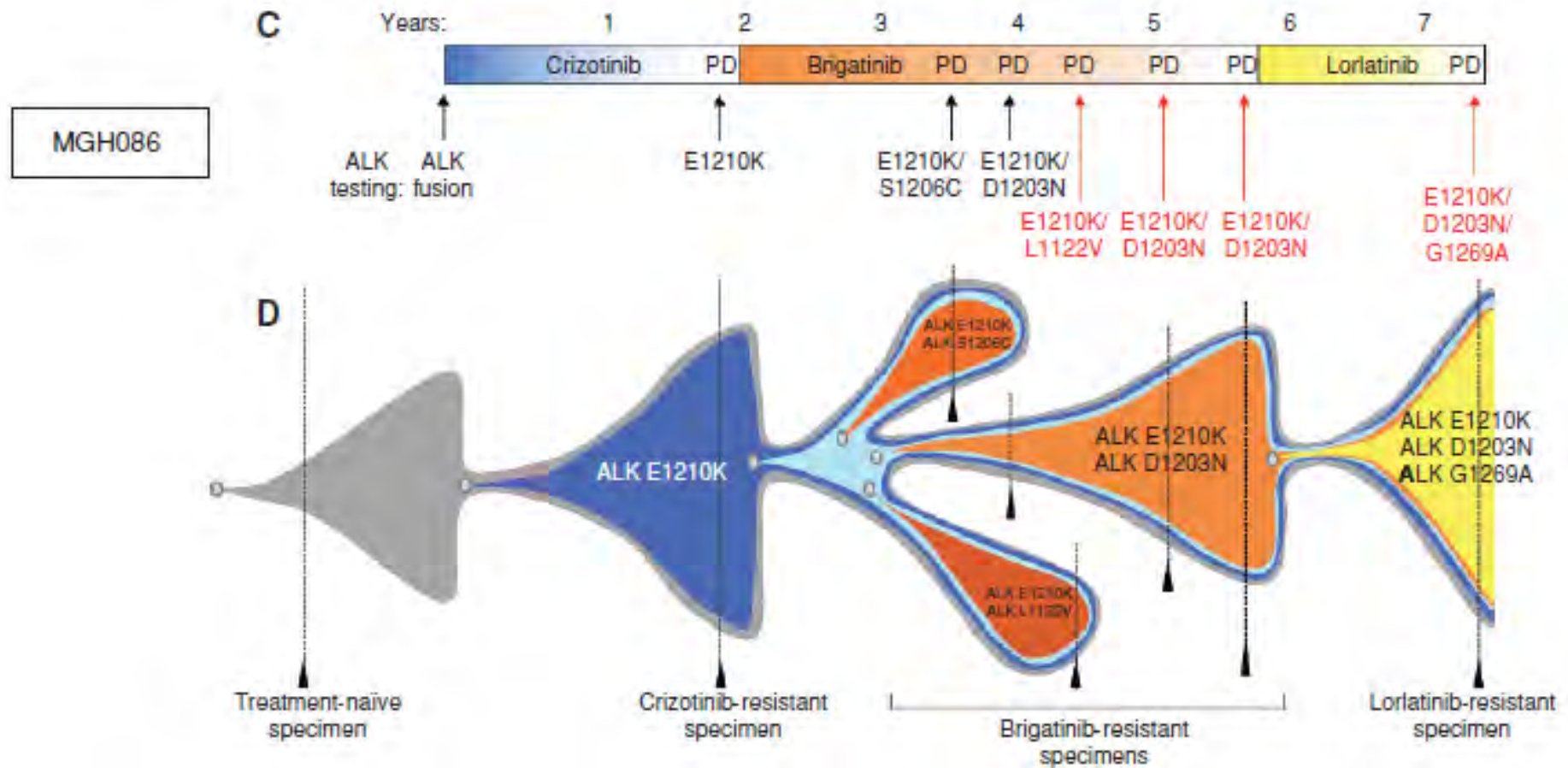
Cellular ALK phosphorylation mean IC₅₀ (nmol/L)

Mutation status	Crizotinib	Ceritinib	Alectinib	Brigatinib	Lorlatinib
Parental Ba/F3	763.9	885.7	890.1	2774.0	11293.8
<i>EML4-ALK V1</i>	38.6	4.9	11.4	10.7	2.3
<i>EML4-ALK C1156Y</i>	61.9	5.3	11.6	4.5	4.6
<i>EML4-ALK I1171N</i>	130.1	8.2	397.7	26.1	49.0
<i>EML4-ALK I1171S</i>	94.1	3.8	177.0	17.8	30.4
<i>EML4-ALK I1171T</i>	51.4	1.7	33.6 ^a	6.1	11.5
<i>EML4-ALK F1174C</i>	115.0	38.0 ^a	27.0	18.0	8.0
<i>EML4-ALK L1196M</i>	339.0	9.3	117.6	26.5	34.0
<i>EML4-ALK L1198F</i>	0.4	196.2	42.3	13.9	14.8
<i>EML4-ALK G1202R</i>	381.6	124.4	706.6	129.5	49.9
<i>EML4-ALK G1202del</i>	58.4	50.1	58.8	95.8	5.2
<i>EML4-ALK D1203N</i>	116.3	35.3	27.9	34.6	11.1
<i>EML4-ALK E1210K</i>	42.8	5.8	31.6	24.0	1.7
<i>EML4-ALK G1269A</i>	117.0	0.4	25.0	ND	10.0
<i>EML4-ALK D1203N+F1174C</i>	338.8	237.8	75.1	123.4	69.8
<i>EML4-ALK D1203N+E1210K</i>	153.0	97.8	82.8	136.0	26.6



Les oncogènes drivers à la progression

ITK ALK 3^{ème} génération



Les oncogènes drivers à la progression

ITK ALK 3^{ème} génération

- Mutations d'ALK
 - Fréquentes :30- 50%
 - Double voire triple mutations d'ALK
 - Mécanisme d'accumulation des mutations
 - ! Perte de mutations

Patient ID	Resistance ^a	Pre-lorlatinib ^b	Post-lorlatinib
MGH947	Primary	—	No ALK mutation
MGH048	Primary	—	No ALK mutation
MGH962	Primary	—	No ALK mutation
MGH952	Primary	No ALK mutation	No ALK mutation
MGH098	Primary	No ALK mutation	No ALK mutation
MGH964	Primary	No ALK mutation	No ALK mutation
MGH9107	Primary	No ALK mutation	No ALK mutation
MGH987	Primary	—	ALK I1171N + L1198F ^c
MGH990	Acquired	—	ALK I1171N + D1203N
MGH9041	Acquired	—	ALK G1202R + G1269A
MGH062	Acquired	ALK C1156Y	ALK C1156Y + L1198F ^d
MGH953	Acquired	ALK G1202R	ALK G1202R + L1196M ^e
MGH087	Acquired	ALK G1202R	ALK G1202R + L1204V + G1269A ^e
MGH086	Acquired	ALK E1210K + D1203N	ALK E1210K + D1203N + G1269A ^e
MGH065	Acquired	ALK L1196M	ALK G1269A
MGH9092	Acquired	ALK I1171N	No ALK mutation
MGH040	Acquired	ALK G1202R	No ALK mutation
MGH9094	Acquired	—	No ALK mutation
MGH9106	Acquired	—	No ALK mutation
MGH9108	Acquired	—	No ALK mutation

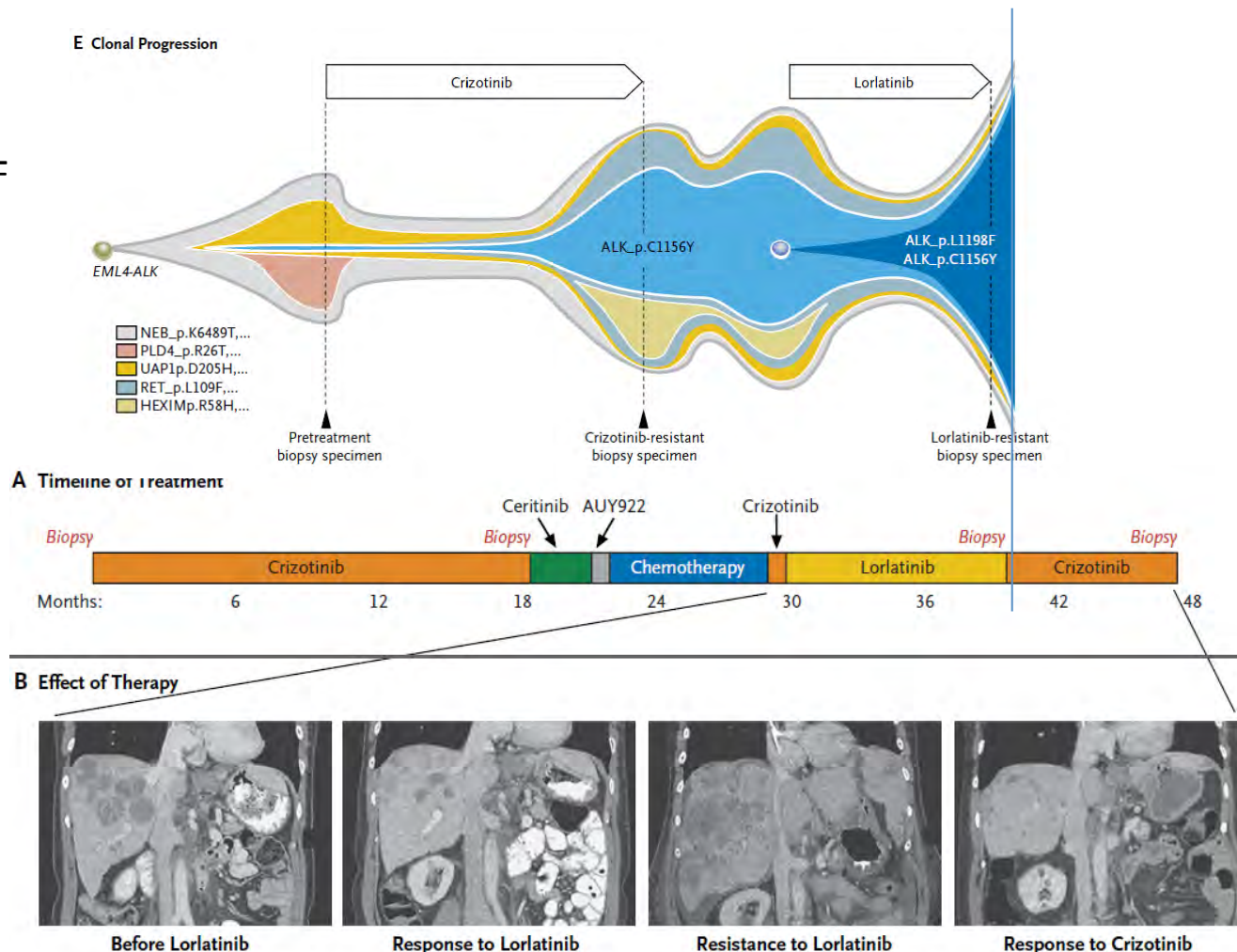


Les oncogènes drivers à la progression

ITK ALK 3^{ème} génération

Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib ALK Resistance Mutation L1198F

- Double mutation C1156Y/I1198F sur le même allèle



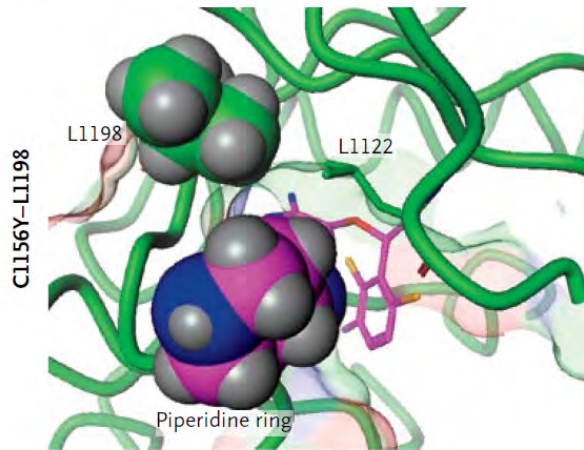
- Réponse à un re-challenge par crizotinib

Les oncogènes drivers à la progression

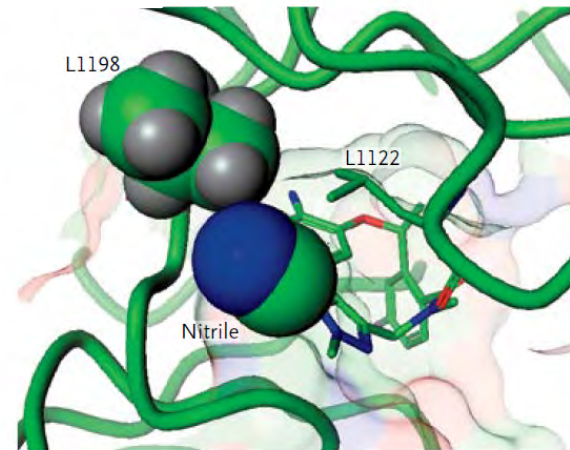
ITK ALK 3^{ème} génération

Resensitization to Crizotinib by the Lorlatinib *ALK* Resistance Mutation L1198F

C1156Y



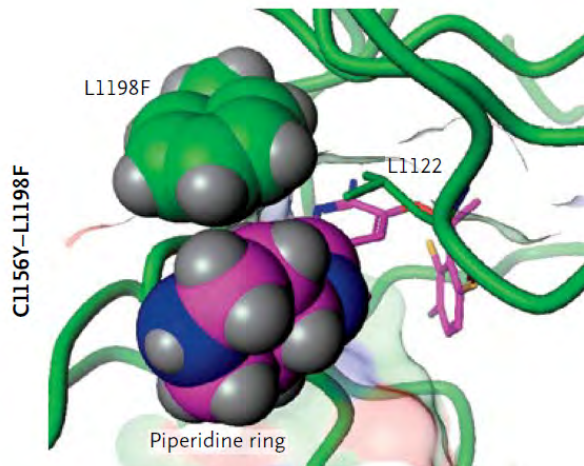
Crizotinib



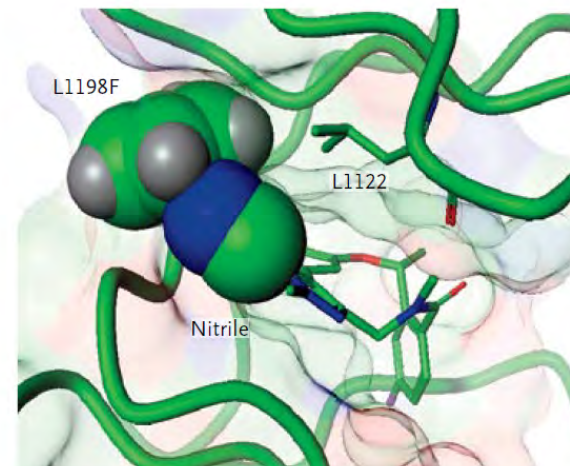
C1156Y

Lorlatinib

C1156Y-
L1198F



Crizotinib



C1156Y-
L1198F

Lorlatinib

Les oncogènes drivers à la progression

ITK ALK 3^{ème} génération

- Mutations associées: *TP53*, *MAP3K*, *NRAS*

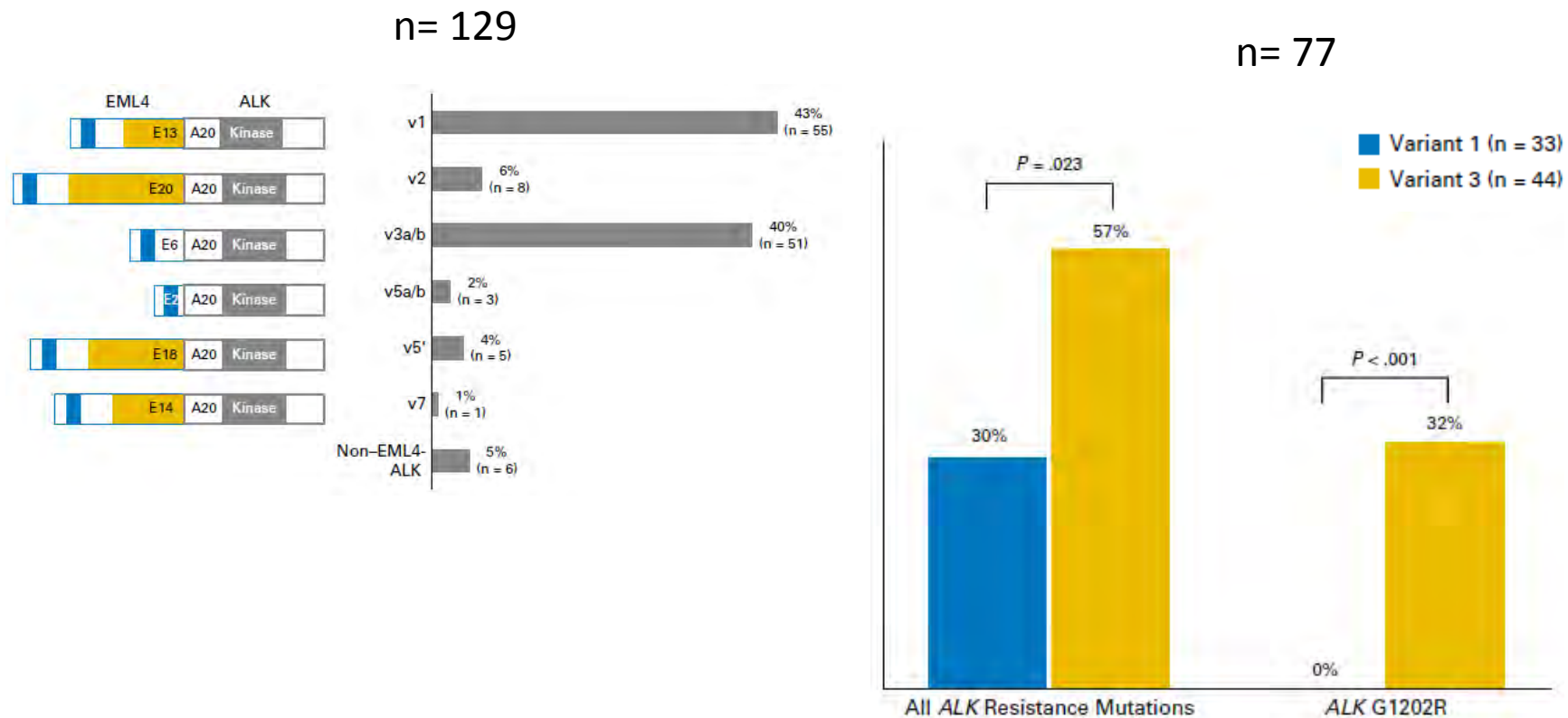
n=20
 NGS ciblé
 FoundationOne®
 Mutations ALK 35%



Les oncogènes drivers à la progression

ITK ALK 1^{er}/2^{ème}/3^{ème} génération

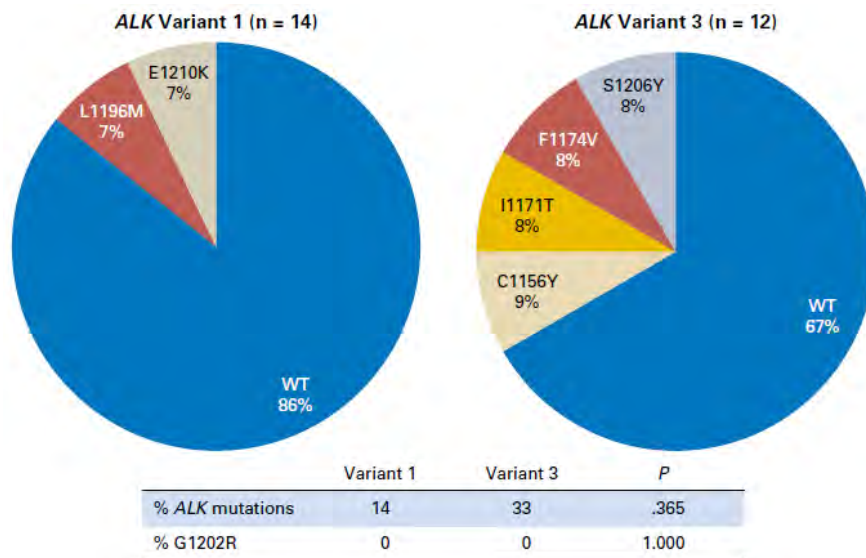
- Impact des variants d'ALK sur les mécanismes de résistance



Les oncogènes drivers à la progression

ITK ALK 1^{er}/2^{ème}/3^{ème} génération

- Impact des variants d'ALK sur les mécanismes de résistance n= 129

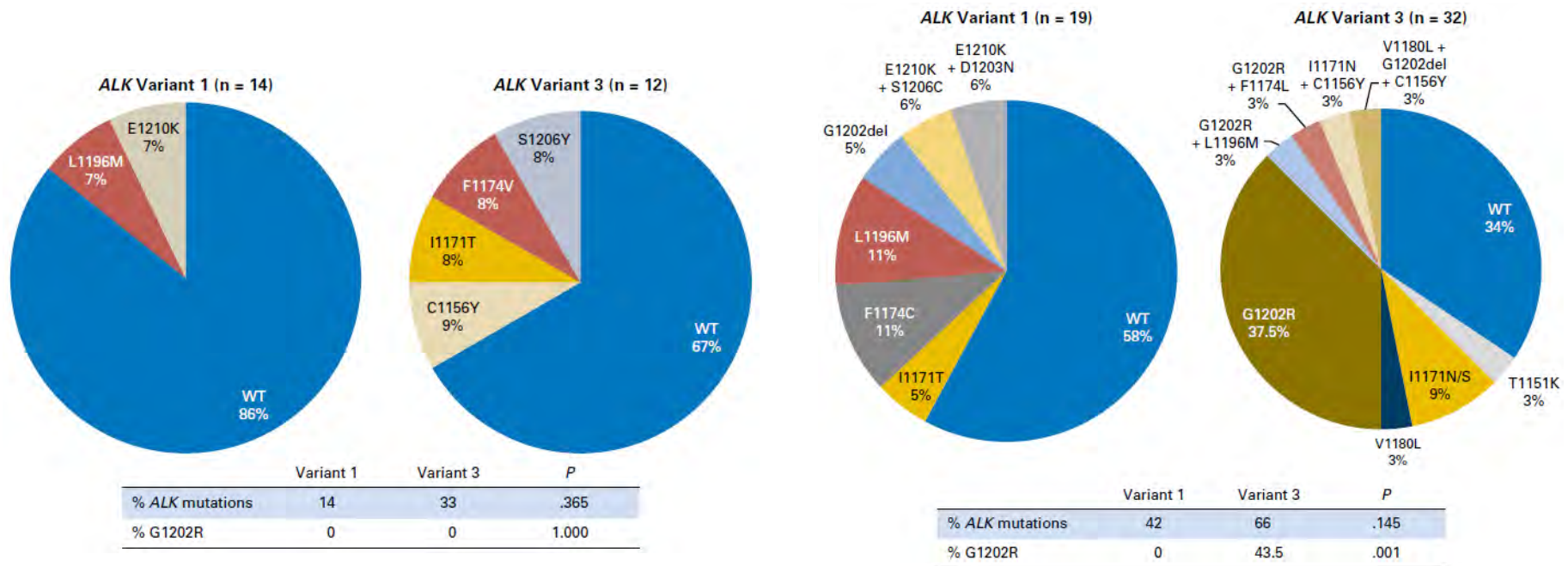


crizotinib

Les oncogènes drivers à la progression

ITK ALK 1^{er}/2^{ème}/3^{ème} génération

- Impact des variants d'ALK sur les mécanismes de résistance n= 129



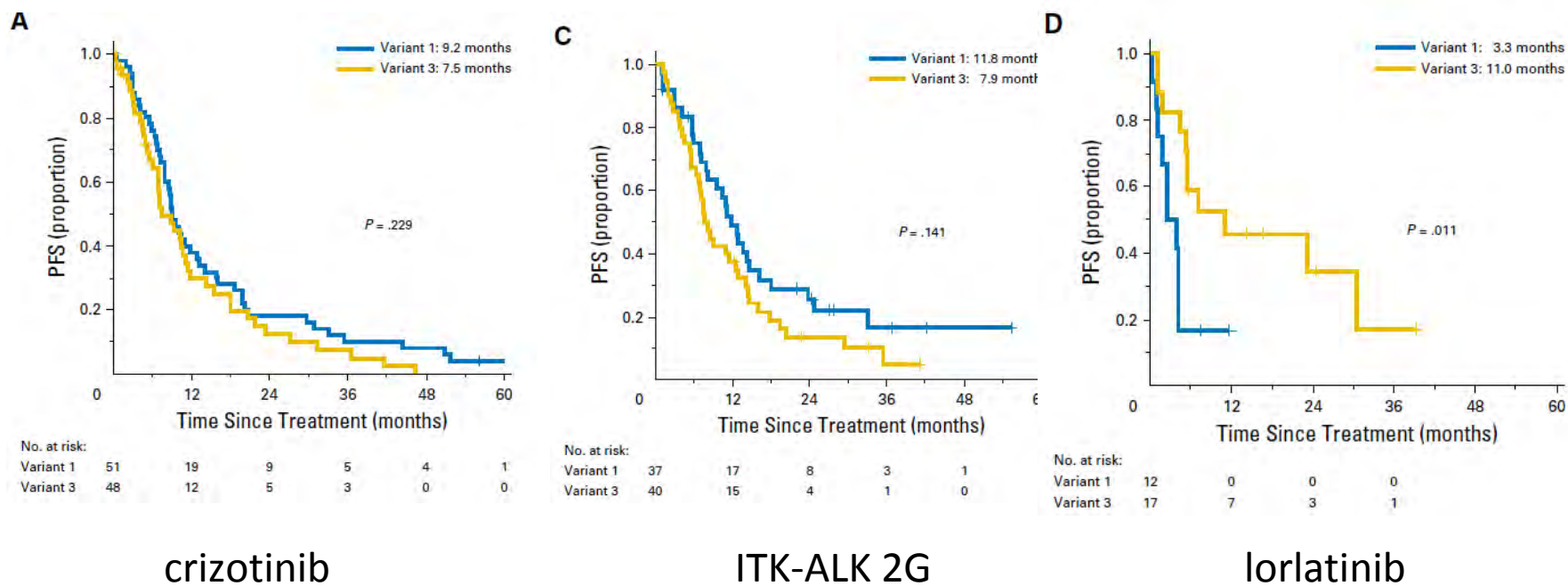
crizotinib

ITL-ALK 2G

Les oncogènes drivers à la progression

ITK ALK 1^{er}/2^{ème}/3^{ème} génération

- Impact des variants d'ALK sur les mécanismes de résistance n= 129

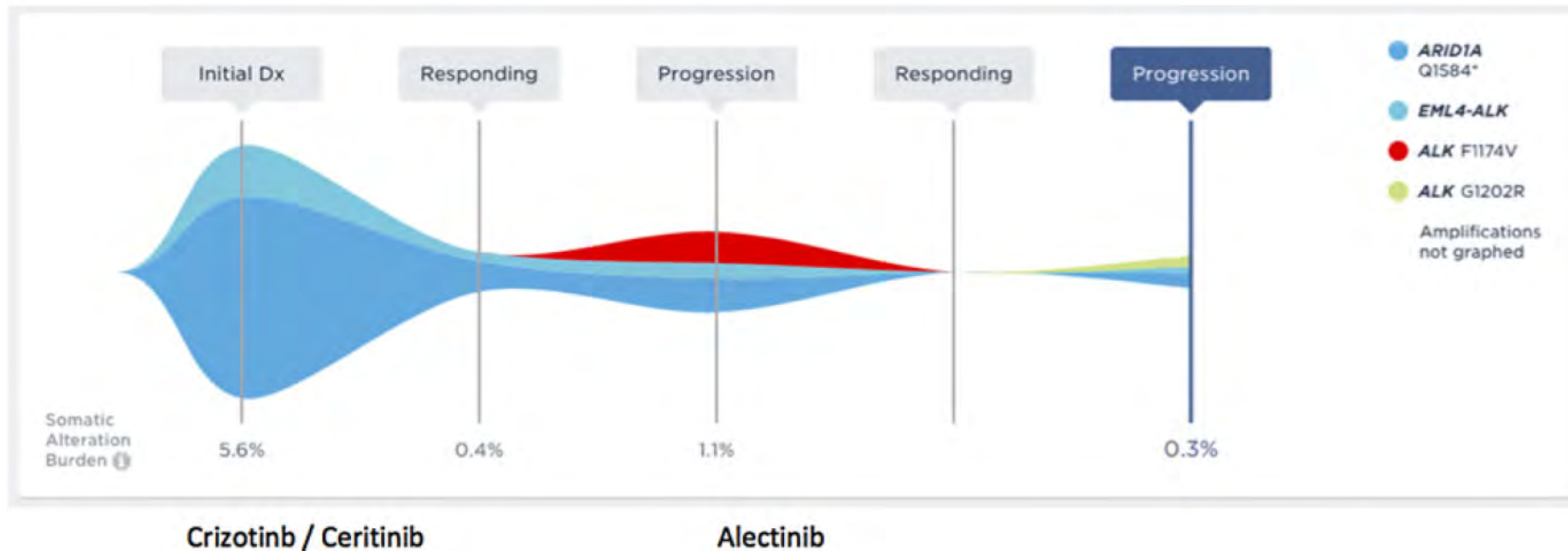


Valeur prédictive du variant EML4 v3 ?

Les oncogènes drivers à la progression

ITK ALK 1^{er}/2^{ème}/3^{ème} génération

- Suivi des mutations *ALK* dans le plasma



NGS-360

Barcoding moléculaire

Les oncogènes drivers à la progression *ITK ALK 1^{er}/2^{ème}/3^{ème} génération*

- Suivi des mutations *ALK* dans le plasma

Platform	Patients	Alteration	Specificity	Sensitivity
ddPCR	Cohort of 101 patients with neuroblastoma	Different <i>ALK</i> point mutations	100%	From 85.7% to 92.4% according to the mutation
ddPCR	20 patients progressing during therapy with Crizotinib	<i>ALK</i> mutations		10 mutations
		<i>KRAS</i> mutations		5 mutations
NGS	22 <i>ALK</i> -positive patients with acquired resistance to <i>ALK</i> TKIs	<i>ALK</i> mutations <i>ALK</i> fusions	Concordance for <i>ALK</i> mutations calls from liquid biopsy and tissue biopsy was 100%	
NGS	Reports providing estimations for the sensitivity of <i>ALK</i> fusion detection with NGS are expected in the near future.			

- Détection des mutations précède la progression clinique
- Intérêt du NGS
- Pas de recommandation actuelle en pratique clinique
- Ne pas oublier le tissu

Les oncogènes drivers à la progression

ITK ALK 1^{er}/2^{ème}/3^{ème} génération

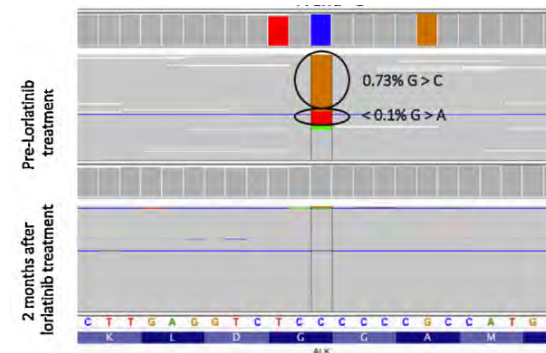
Altération moléculaire	ITK	Mécanisme de résistance	Biopsie tissulaire	Biopsie liquide
Réarrangement ALK	ITK-ALK 1 ^{ère} ou 2 ^{ème} génération crizotinib ceritinib, alectinib brigatinib	<p>Mutations ALK crizotinib (30%) L1196M ceritinib (50%) G1202R, F1174L/C alectinib (50%) G1202R, I1171T/N/S brigatinib (70%) G1202R, E1210K, S1206Y/C, D1203N</p> <p>Amplification ALK</p> <p>Perte de la translocation ALK</p> <p>Activation de voies de signalisation alternatives Amplification MET, HER2 Mutation PIK3CA</p> <p>Transformation phénotypique (CBPC, EMT, ...)</p>	<p>+++</p> <p>+++</p> <p>+++</p> <p>+++</p> <p>+++</p> <p>+++</p>	<p>+++</p> <p>+++</p> <p>-</p> <p>+++</p> <p>+++</p> <p>-</p>
Réarrangement ALK	ITK-ALK lorlatinib	<p>Mutations ALK (50%) C1156Y/L1198F, G1202R/G1269A, G1202R/L1204V/G1269A ...</p> <p>Activation de voies de signalisation alternatives Mutation TP53, ERK, NRAS</p>	<p>+++</p> <p>+++</p>	<p>+++</p> <p>+++</p>

Les oncogènes drivers à la progression *ITK ALK 1^{er}/2^{ème}/3^{ème} génération*

Combinaison de mécanismes

Transformation phénotypique + mutation d'ALK G1202R

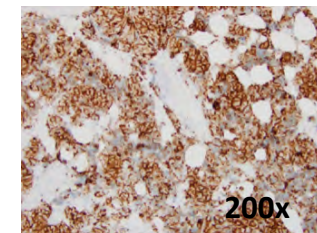
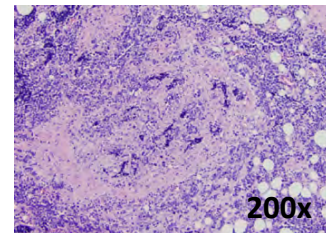
- CBNPC avec translocation ALK
- Progression après ceritinib puis alectinib
- Détection G1202R (ALK) dans plasma
- Traitement par lorlatinib
- Réponse cérébrale, disparition de la G1202R dans plasma de manière récurrente



- Épanchement péricardique:

- CBPC, ALK +

CBPC



IHC ALK + (D5F3)

- NGS:

- nouvelles mutations mutation *Rb* (C706Y) et *TP53*

Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
HER2, cMETd14, KRAS

Recherche de translocations
ALK, ROS1
RET, NRG1, NTRK

Biopsie tissulaire

Si non réalisable/informatif:
biopsie liquide

Technique ciblée
NGS ciblé

Biopsie tissulaire

IHC
FISH
RT-PCR
NGS ciblé

A la progression

ITK ALK 1^{ère}/2^{ème}/3^{ème} génération

Recherche de mutations de résistance ALK,
I1171T/N/S, F1174L/C, L1196M, G1202R ...

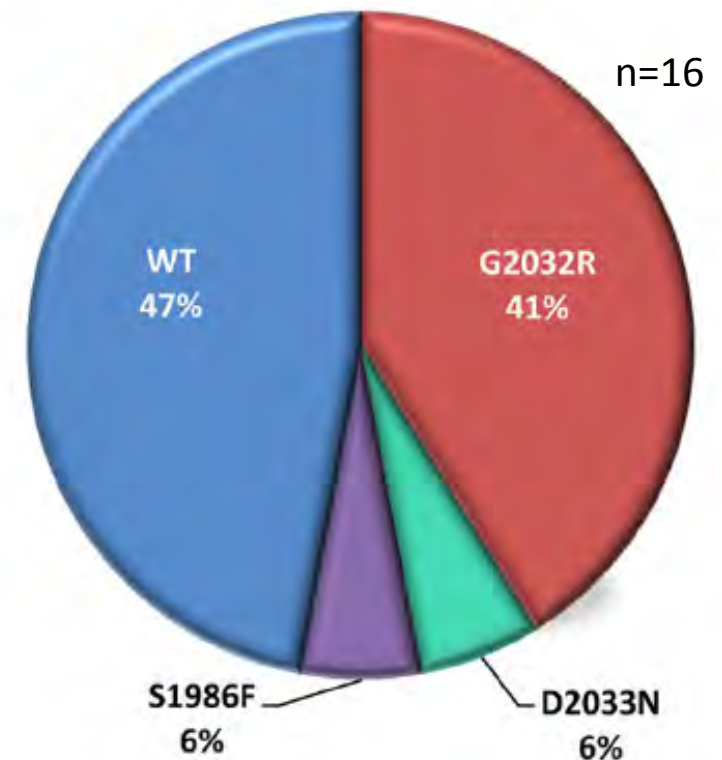
Biopsie tissulaire ou liquide

NGS ciblé

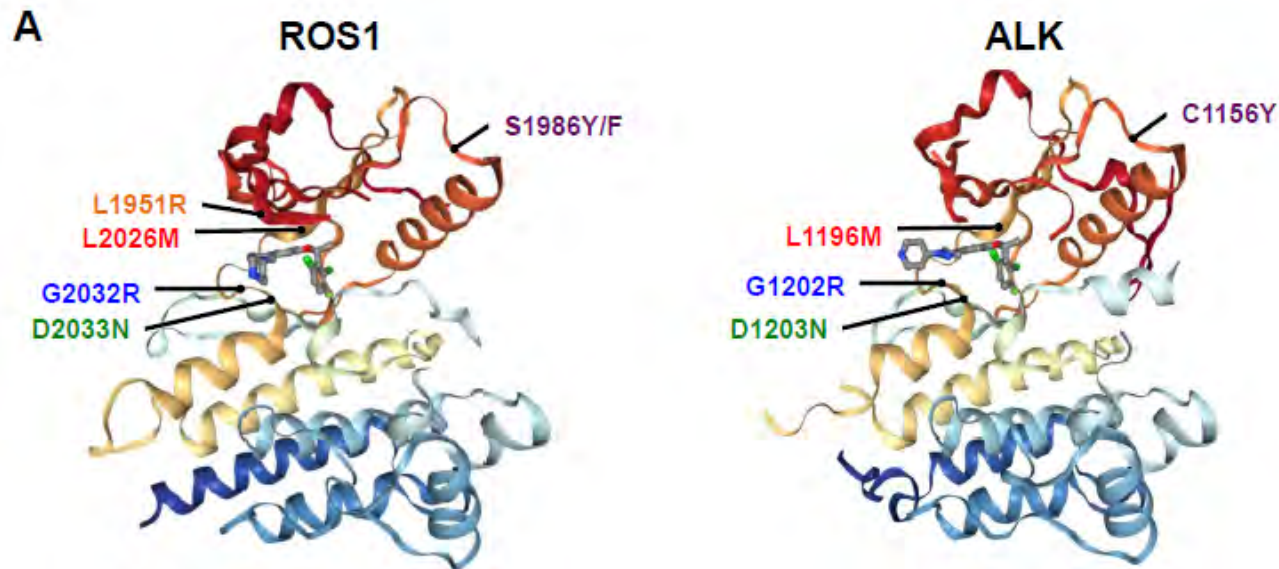
Les oncogènes drivers à la progression *ITK ROS1 1ère génération*

- Moins de données moléculaires connues
- Mutations de *ROS1*: G2032R
 - chez plus de 50% des patients
 - non récurrentes
- Persistance de la translocation à la résistance
- Pas d'amplification de *ROS1*
- Activation de voies de signalisation alternatives
 - Mutations d'autres gènes: *TP53*, *KIT*, *PI3KCA*, *BRAF*, *PI3KCA*

+ transformation histologique: transition épithélio-mésenchymateuse



Les oncogènes drivers à la progression *ITK ROS1 1ère génération*



	Gatekeeper L2026M	α C helix S1986Y/F	G2032R	Solvent front D2033N	L1951R
Crizotinib	No	No	No	No	No
Ceritinib	Yes	No	No	No	No
Brigatinib	Yes	Unknown	No	No	No
Lorlatinib	Yes	Yes	Yes/No	Yes	Unknown
Entrectinib	No	Unknown	No	Unknown	Unknown
TPX-0005	Yes	Unknown	Yes	Yes	Unknown
Cabozantinib	Yes	Unknown	Yes	Yes	Yes

Les oncogènes drivers à la progression

ITK ROS1 1ère génération

Altération moléculaire	ITK	Mécanisme de résistance	Biopsie tissulaire	Biopsie liquide
Réarrangement ROS1	ITK-ALK crizotinib	Mutations ROS1 (50%) G2032R, D2033N, S1966F/Y, L2026F ... Activation de voies de signalisation alternatives Mutation TP53, KIT, PI3KCA, BRAF	+++ +++	+++ +++

Patient avec CBNPC de type non épidermoïde de stade localement avancé ou métastatique



Au diagnostic

Recherche de mutations d'oncogènes drivers
EGFR, BRAF
HER2, cMETd14, KRAS

Recherche de translocations
ALK, ROS1
RET, NRG1, NTRK

Biopsie tissulaire

Si non réalisable/informatif:
biopsie liquide

Technique ciblée
NGS ciblé

Biopsie tissulaire

IHC
FISH
RT-PCR
NGS ciblé

A la progression

ITK EGFR 1^{ère}/2^{ème} génération

Recherche de mutation de résistance EGFR, T790M

Biopsie liquide

Si négatif: biopsie tissulaire
Répéter biopsie liquide

Technique ciblée
PCR digitale

Histologie

ITK ALK 1^{ère}/2^{ème}/3^{ème} génération

Recherche de mutations de résistance ALK,
I1171T/N/S, F1174L/C, L1196M, G1202R ...

Biopsie tissulaire ou liquide

NGS ciblé

A la progression

ITK EGFR 3^{ème} génération

Recherche de mutation de résistance EGFR: C797S, L718Q, L844V ...
Perte de la mutation EGFR T790M

Biopsie liquide

Si négatif: biopsie tissulaire
Répéter biopsie liquide

Technique ciblée
PCR digitale
NGS ciblé

Histologie

Conclusion

- Au diagnostic
 - Analyse moléculaire mais quelles valeurs ajoutées des nouvelles techniques ?
 - Délai rendu
 - Biopsies liquides +

Conclusion

- Au diagnostic
 - Analyse moléculaire mais quelles valeurs ajoutées des nouvelles techniques ?
 - Délai rendu
 - Biopsies liquides +
- Au suivi: monitoring via biopsies liquides +++
 - *EGFR* T790M solide/liquide
 - Anticipation des résistances ?
 - Quelles altérations moléculaires rechercher à la résistance et qu'en faire?
 - Suivi des « niches » et drogues de nouvelles générations; L1?

Conclusion

- Au diagnostic
 - Analyse moléculaire mais quelles valeurs ajoutées des nouvelles techniques ?
 - Délai rendu
 - Biopsies liquides +
- Au suivi: monitoring via biopsies liquides +++
 - *EGFR* T790M solide/liquide
 - Anticipation des résistances ?
 - Quelles altérations moléculaires rechercher à la résistance et qu'en faire?
 - Suivi des « niches » et drogues de nouvelles générations; L1?
- Biologie en avance sur la clinique