ADN tumoral circulant et mutation *EGFR* T790M

Circulating tumour DNA and T790M mutation in the EGFR gene

Audrey Vallée[1]
Marc Denis[1]
Judith Raimbourg[2]
Jaafar Bennouna[2]

[1] CHU Hôtel-Dieu
Plateforme INCa de génétique moléculaire des cancers
Laboratoire de biochimie
9, quai Moncousu
44093 Nantes Cedex 01
France
<audrey.vallee@chu-nantes.fr>
<marc.denis@chu-nantes.fr>

[2] Institut de cancérologie de l'Ouest
centre René Gauducheau
Service d'oncologie médicale ICO René Gauducheau
Boulevard du Professeur Jacques Monod
44800 St Herblain
France
<judith.raimbourg@ico.unicancer.fr>
<jaafar.bennouna@ico.unicancer.fr>

Remerciements et autres mentions :

Financement : aucun.

Liens d'intérêts : Interventions en rapport avec l'article : conférences pour AstraZeneca, advisory board pour Qiagen et A2. Essai clinique en rapport avec l'article : investigation pour essai thérapeutique avec 2D9291.

Tirés à part : M. Denis

RÉSUMÉ

De nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR, actifs sur la mutation T790M, sont en cours d'évaluation dans le cancer bronchique non à petites cellules avec des résultats prometteurs. Leur développement est rendu possible par des techniques de détection de la mutation T790M hautement sensible sur les ADN tumoraux circulants.

● Mots clés : EGFR ; mutation ; ADN ; plasma.

ABSTRACT

New tyrosine kinase inhibitors against EGFR, which act on the T790M mutation, are currently being assessed in NSCLC with promising results. Their development is possible due to highly sensitive techniques to detect the T790M mutation on cell-free DNA derived from tumour cells.

● *Key words: EGFR; mutation; DNA; plasma.*

Nous rapportons le cas d'une patiente suivie dans notre institution (Institut de cancérologie de l'Ouest) pour un adénocarcinome bronchique métastatique traité par un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) de 3e génération, après la mise en évidence de la mutation de résistance T790M. Ce cas clinique a pour but d'illustrer les nouvelles thérapeutiques bientôt disponibles dans le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) *EGFR* mutés et la place de la biopsie liquide dans la prise en charge des patients.

Notre patiente est Mme B., 68 ans, non fumeuse, exposée à l'amiante au cours de son activité professionnelle, sans antécédents particuliers par ailleurs. En juin 2010, est diagnostiqué un adénocarcinome bronchique TTF1 + lobaire supérieur droit métastatique pulmonaire bilatéral et osseux (2e côte gauche et os occipital avec contact méningé). Une délétion d'un fragment de l'exon 19 du gène de l'EGFR (del19), mutation activatrice, est mise en évidence sur la tumeur par PCR (*polymerase chain reaction*) et analyse de taille de fragments. La patiente reçoit successivement trois lignes de traitements par gefitinib (12 mois), cisplatine plus pemetrexed avec pemetrexed entretien (15 mois), puis dans le cadre d'un essai de phase I taxotère + afatinib (13 mois). L'essai est interrompu en raison d'une progression pulmonaire et cérébrale. Elle bénéficie d'une irradiation encéphalique. En janvier 2015, dans le cadre d'un essai de phase I testant un inhibiteur de tyrosine kinase de 3e génération, l'AZD9291, une recherche de la mutation de résistance T790M sur l'exon 20 est réalisée sur un prélèvement sanguin. Le test retrouve la mutation del19 de la tumeur dans le plasma et détecte également la mutation T790M. La patiente est incluse dans l'essai et débute son traitement en février 2015. Elle est actuellement sous AZD9291, avec une réponse partielle des lésions prises pour cibles et une absence de symptomatologie liée à la maladie. Deux nouvelles analyses sur ADN circulant réalisées après 4 et

Pour citer cet article : Vallée A, Denis M, Raimbourg J, Bennouna J. ADN tumoral circulant et mutation *EGFR* T790M. *Innov Ther Oncol* 2015 ; 1 : 24-26. doi : 10.1684/ito.2015.0004

right © 2017 John Libbey Eurotext. Téléchargé par INSTITUT UNIV DU CANCER DE TOULOUSE ONCOPOLE MEDIATHEQUE - 194.167.35.114

doi: 10.1684/ito.2015.0004

right © 2017 John Libbey Eurotext. Téléchargé par INSTITUT UNIV DU CANCER DE TOULOUSE ONCOPOLE MEDIATHEQUE CANCER le 04/07/:

8 semaines de traitement ne détectent plus les mutations del19 et T790M.

La mutation T790M est retrouvée chez 50 % des patients à progression sous ITK 1re et 2e génération, ce qui en fait le mécanisme de résistance le plus fréquent [1]. L'afatinib, ITK irréversible de 2e génération, possède pourtant une activité *in vitro* en présence d'une mutation T790M. Cependant en pratique clinique, son efficacité est difficilement évaluable. Les données de l'étude LUX-lung 1, dans laquelle la mutation T790M n'a pu être confirmée que sur huit patients, ne permettent pas de conclure sur son efficacité dans cette situation [2]. De nouveaux ITK de 3e génération, actifs sur les mutations activatrices connues et sur la mutation de résistance T790M, sont en cours de développement. L'AZD9291 a été évalué dans une étude de phase I/II après échec d'un ITK, les patients pouvant avoir préalablement été traités par chimiothérapie (80 % des cas). La phase I a permis de mettre en évidence une tolérance satisfaisante, la dose maximum tolérée n'ayant pas été atteinte. Les effets secondaires les plus fréquents sont la diarrhée et le rash cutané. Les taux de réponse, de contrôle de la maladie et de survie sans progression (SSP) observés aux cours de la phase II sont respectivement de 61 %, 95 % et 9,8 mois pour les patients T790M+, et de 21 %, 61 % et 2,8 mois pour les patients T790M- [3]. Le CO-1686 (rociletinib), un autre inhibiteur de 3e génération, a également été évalué dans une étude de phase I/II testant la tolérance (phase I) et le taux de réponse (phase II) chez 130 patients lourdement prétraités. Le rociletinib a permis d'obtenir des taux de réponse de 56 % pour les patients T790M+ et 29 % en cas de T790M-. Les effets secondaires les plus fréquents sont l'hyperglycémie (22 % grade 3) et l'allongement du QTc (5 % de grade 3) sans trouble du rythme [4]. Enfin une troisième molécule, HM61713, a montré des taux de réponse autour de 26 % et un taux de contrôle de la maladie de 75 % en présence d'une mutation T790M dans un essai de phase I, après échec des ITK. La tolérance est également satisfaisante, marquée par des céphalées, nausées et rash cutané de grade 1 à 2 [5].

« Nouveaux ITK actifs sur la mutation *EGFR* T790M »

Ces résultats prometteurs ont conduit à des essais cliniques en deuxième ligne *versus* chimiothérapie après échec d'un ITK dont les résultats sont attendus prochainement. La recherche de la mutation T790M, notamment à progression, va donc devenir rapidement indispensable. Si le tissu reste le matériel tumoral de référence, les biopsies liquides, prélèvements sanguins simples, rapides, non invasifs et répétables, pourraient être utilisés comme un matériel de pré-criblage dans le contexte d'un patient à progression avant la programmation d'une nouvelle biopsie.

Une méta-analyse de 2014 concluait à une sensibilité globale de 67,4 % et une spécificité de 93,5 % pour la détection des mutations activatrices *EGFR* (del19 et L858R) sur ADN circulants *versus* tissus tumoraux [6]. Post-ITK, les comparaisons avec le tissu pour la détection de la mutation T790M sont encore rares, les rebiopsies étant difficiles à obtenir, mais les sensibilités des tests seraient similaires. Le kit Cobas EGFR Blood Test (*Roche Molecular Systems*), technique de PCR spécifique d'allèle, a ainsi détecté sur plasmas 63 % des mutations T790M (17/27) qui avaient été détectées sur tissus [7]. La mutation est détectable de plusieurs semaines à plusieurs mois (jusqu'à 344 jours) avant la progression clinique selon les critères RECIST [8, 9]. Sur des séries non triées de plasmas collectés post-ITK, le même kit détecte la mutation chez 39 % des patients (9/23) [8]. En revanche, un autre kit de PCR allèle spécifique (*Amoy Diagnostics*) ne détecte la mutation que chez 25,2 % des patients contre 43 % avec la PCR digitale sur les 135 patients testés [10].

« 70 % des mutations tumorales retrouvées sur ADN plasmatique »

La PCR digitale fait partie des nouveaux outils quantitatifs qui se développent et éclairent progressivement les mécanismes moléculaires en jeu en cours de traitement. Le principe de la PCR digitale, comme la technique dite de BEAMing, est d'amplifier séparément chaque molécule d'ADN, soit par une technique de PCR en émulsion sur billes (BEAMing), soit par partitionnement des molécules d'ADN dans des puits ou gouttelettes (PCR digitale). Une 3e technique quantitative est le séquençage nouvelle génération (NGS), technique de séquençage multiplexé d'un ensemble de cibles et de plusieurs patients en parallèle, qui permet d'établir des profils moléculaires larges et d'analyser la fréquence et la provenance allélique des altérations.

Ces techniques montrent que la mutation T790M serait détectable dans le plasma avant la première ligne de traitement chez environ 30 % des patients [9], en quantité faible à très faible, les pourcentages en copies mutées ne dépassant pas les 5 % en PCR digitale [10-12]. Cette quantité est plus importante à progression avec des fréquences de 0,03 à 9,5 % [10, 12], et la T790M représenterait de 13 à 94 % de la fraction mutée totale (T790M/mutation activatrice) [12]. Si la fréquence de la mutation avant traitement a une valeur pronostique encore incertaine [10, 11], il semble que les patients qui connaissent une augmentation de la mutation T790M en cours de traitement bénéficient d'une meilleure SSP et survie globale [10] alors qu'une mutation qui devient indétectable après traitement est associée à des SSP et SG plus courtes [11]. Ce phénomène serait lié aux caractéristiques des clones tumoraux T790M+ connus pour leur croissance lente et donc associés à des tumeurs moins agressives qui évoluent plus lentement [11].

Alors que le bénéfice des ITK de 3e génération en deuxième ligne est actuellement évalué, les premiers essais en première ligne sont en cours. La mutation T790M est en effet présente avant la première ligne de thérapie, probablement dans un sous-clone tumoral difficilement

right © 2017 John Libbey Eurotext. Téléchargé par INSTITUT UNIV DU CANCER DE TOULOUSE ONCOPOLE MEDIATHEQUE CANCER le 04/07/

Take home messages

- La présence d'une mutation T790M de l'*EGFR* est la première cause de résistance aux ITK de 1re et 2e génération.
- Les nouveaux ITK permettent des taux de réponses de 50 % en cas de mutation T790M après échec d'un ITK de 1re et 2e génération.
- Jusqu'à 70 % des mutations tumorales sont retrouvées dans l'ADN tumoral plasmatique en utilisant des techniques adaptées.
- L'ADN tumoral circulant peut être utilisé pour la recherche de la mutation T790M en *pré-screening* avant rebiopsie.
- Le développement de techniques quantitatives sensibles (NGS, PCR digitale) permet la réalisation de cinétiques moléculaires en cours de traitement.

détectable par les techniques classiques [13]. Avec des techniques sensibles, la T790M serait retrouvée chez 40 % à 80 % des patients porteurs d'une mutation *EGFR* activatrice (del19, L858R) [14], mais certaines équipes alertent sur le risque de faux positifs liés à la qualité des ADN extraits des prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE). Ye *et al.* [15] ont notamment montré que sur 36 tumeurs, la mutation T790M était retrouvée sur 41,7 % des tissus FFPE contre 2,8 % seulement des tissus correspondants congelés [15]. Les ADN circulants s'affranchissent des modifications induites par le fixateur et sont théoriquement représentatifs de l'ensemble des clones tumoraux, mais la faible représentation de la mutation dans le tissu avant traitement rend sa détection dans le plasma d'autant plus difficile. Par exemple, le kit Cobas (PCR allèle spécifique) qui détecte 39 % de mutation T790M à progression ne détecte aucune mutation dans les plasmas pré-traitement correspondants [8], alors que la PCR digitale précédemment citée détecte la mutation avant la première ligne de traitement chez 30 % des patients [9]. Les techniques les plus sensibles sont donc indispensables mais elles restent à implanter et à valider dans les laboratoires.

Enfin, tout récemment une nouvelle mutation du gène *EGFR*, la mutation C797S, a été identifiée par séquençage de nouvelle génération (NGS) comme mutation de résistance à l'AZD9291. La mutation peut être présente sur le même allèle que la T790M ou sur un allèle différent, indiquant la sélection d'un sous-clone tumoral pendant le traitement aux ITK de 3e génération [16]. Ces derniers résultats soulignent la multitude des mécanismes de résistance et la dynamique moléculaire que seuls des prélèvements aussi simples et répétables que les biopsies liquides, associées à des techniques de détection sensibles et quantitatives, permettront de mettre en évidence.

RÉFÉRENCES

1. Fenizia F, De Luca A, Pasquale R, *et al.* EGFR mutations in lung cancer: from tissue testing to liquid biopsy. *Future Oncol* 2015 ; 11 (11) : 1611-23.

2. Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, *et al.* Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2012 ; 13 (5) : 528-38.

3. Janne PA, Yang JC, Kim DW, *et al.* AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015 ; 372 (18) : 1689-99.

4. Sequist LV, Soria JC, Goldman JW, *et al.* Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015 ; 372 (18) : 1700-9.

5. Kim DW, Lee DH, Kang JH, *et al.* Clinical activity and safety of HM61713, an EGFR-mutant selective inhibitor, in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts) with EGFR mutations who had received EGFR tyrosine kinase inhibitors (ITKs). *J Clin Oncol* 2014 ; 32 : 5s (suppl; abstr 8011).

6. Luo J, Shen L, Zheng D. Diagnostic value of circulating free DNA for the detection of EGFR mutation status in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2014 ; 4 : 6269.

7. Sun JM, Karlovich C, Wen W, *et al.* Serial monitoring of plasma EGFR T790M levels and evaluation of EGFR mutational status in matched tissue and plasma from NSCLC patients treated with CO-1686. *Mol Cancer Ther* 2013 ; 12 (11 Suppl) : B25.

8. Sorensen BS, Wu L, Wei W, *et al.* Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib. *Cancer* 2014 ; 120 (24) : 3896-901.

9. Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, *et al.* Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* 2014 ; 20 (6) : 1698-705.

10. Wang Z, Chen R, Wang S, *et al.* Quantification and dynamic monitoring of EGFR T790M in plasma cell-free DNA by digital PCR for prognosis of EGFR-TKI treatment in advanced NSCLC. *PLoS One* 2014 ; 9 (11) : e110780.

11. Isobe K, Hata Y, Tochigi N, *et al.* Usefulness of nanofluidic digital PCR arrays to quantify T790M mutation in EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Cancer Genomics Proteomics* 2015 ; 12 (1) : 31-7.

12. Taniguchi K, Uchida J, Nishino K, *et al.* Quantitative detection of EGFR mutations in circulating tumor DNA derived from lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2011 ; 17 (24) : 7808-15.

13. Inukai M, Toyooka S, Ito S, *et al.* Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006 ; 66 (16) : 7854-8.

14. Denis MG, Vallee A, Theoleyre S. EGFR T790M resistance mutation in non small-cell lung carcinoma. *Clin Chim Acta* 2015 ; 444 : 81-5.

15. Ye X, Zhu ZZ, Zhong L, *et al.* High T790M detection rate in TKI-naive NSCLC with EGFR sensitive mutation: truth or artifact? *J Thorac Oncol* 2013 ; 8 (9) : 1118-20.

16. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, *et al.* Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med* 2015 ; 21 (6) : 560-2.