

INTRODUCTION :

Le cancer du sein métastatique (CSM) est la deuxième cause de décès par cancer chez les femmes dans les pays occidentaux [1]. Malgré les récents progrès réalisés pour les tumeurs présentant une surexpression de ERBB2, l'évolution des autres phénotypes ne s'est guère améliorée ces dernières années et le taux de survie à 5 ans pour le CSM reste faible (26 %) [2].

La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT/cible mammifère de la rapamycine (mTOR) est fréquemment activée dans les cancers du sein HER2-négatifs [3]. Elle est associée à la carcinogenèse du sein, à la positivité des récepteurs hormonaux, à la survie et à la résistance aux hormonothérapies [4,5]. De plus, elle peut jouer un rôle dans la résistance à la chimiothérapie, y compris les taxanes qui sont les principaux médicaments cytotoxiques utilisés pour le CSM [6].

À ce jour, l'alpélisib est le seul traitement ciblant PI3K qui a été décrit comme améliorant la survie dans le cadre des CSM en association avec une hormonothérapie [7]. Son efficacité est limitée aux tumeurs ayant une mutation de *PI3KCA*. D'autres molécules ciblant cette voie sont en cours de développement, comme les inhibiteurs d'AKT. LY2780301 est un double inhibiteur de la p70S6 kinase et d'AKT, qui s'est révélé sûr en monothérapie [8], ainsi qu'en association avec la gemcitabine pour les tumeurs solides avancées présentant des altérations de la voie PI3K/AKT/mTOR [9]. L'essai de phase IB/II (TAKTIC) a évalué l'innocuité et l'efficacité de l'association LY2780301-paclitaxel chez les patientes ayant un CSM HER2-négatif, avec un taux de réponse objective (ORR) à 6 mois de 63% pour l'ensemble de la population et 56% pour les 18 patientes avec altération de la voie PI3K/AKT/mTOR [10].

D'autres inhibiteurs de d'AKT ont été étudiés pour traiter le cancer du sein. L'association ipatasertib-paclitaxel n'a pas permis d'améliorer les taux de réponse pathologique après un traitement néoadjuvant dans le cancer du sein triple négatif précoce [11], mais augmente la survie sans progression (SSP) en cas de phase métastatique pour ces même tumeurs triple-négatives [12], tout comme le capivasertib [13]. Le Capivasertib n'a pas amélioré la SSP que cela soit dans l'ensemble de la population, ou dans le sous-groupe des tumeurs mutées *PIK3CA*, lorsqu'il est combiné au paclitaxel pour les CSM HER2-négatif et récepteur oestrogénique positif [14]. Combiné au fulvestrant, dans le même contexte, il permet une amélioration de la SSP [15]. Cependant, les altérations de la voie PI3K/AKT/mTOR ne sont pas prédictives de l'efficacité du traitement.

L'étude de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) permet de surveiller la réponse ainsi que la résistance aux thérapies systémiques et permet de mieux documenter l'hétérogénéité tumorale que les biopsies tissulaires [16]. Pour le cancer du sein, il a été démontré que les variations de l'ADNtc sont plus sensibles pour détecter les modifications d'évolution de la maladie que les marqueurs tumoraux actuellement utilisés tels que le Ca15-3 [17,18]. Des résultats similaires ont été publiés pour de nombreux sites tumoraux dont le cancer du poumon [19] et le cancer colorectal [20]. L'ADNtc est également un marqueur prédictif de l'efficacité de certains traitements, comme dans le cas du cancer du poumon non à petites cellules, non épidermoïde avec la mutation T790M de l'*EGFR*, pour lequel l'osimertinib peut être administré sur la simple base d'une analyse plasmatique [21]. En ce qui concerne le CSM, la *Food and Drug Administration* (FDA) a récemment approuvé l'alpelisib et un test compagnon (le kit *therascreen*® *PIK3CA* RGQ PCR) pour détecter les mutations *PIK3CA* dans du tissu et/ou du plasma. Les analyses plasmatiques de l'essai SOLAR1 ont en effet montré que l'efficacité de l'alpélisib peut être prédite par les résultats de l'ADNtc [22]. Le Hazard ratio (HR) de la PFS était de 0,55 (95% CI 0,39-0,79) pour les patientes ayant une mutation de *PIK3CA* mise en évidence dans l'ADN plasmatique contre 0,80 (95% CI 0,60-1,06) pour les patientes sans mutation de *PIK3CA* dans le plasma.

L'objectif de ce travail était d'évaluer la valeur pronostique de l'ADNtc et de ces variations pour les patientes incluses dans l'essai TAKTIC. Nous avons évalué les corrélations entre les critères cliniques d'efficacité (ORR et SSP), l'identification et le suivi de l'ADNtc plasmatique grâce à deux approches distinctes (droplet digital PCR (ddPCR) et séquençage du génome entier à faible couverture (LC-WGS)).

MATERIEL ET METHODES :

Plan d'étude, patientes et collecte d'échantillons

TAKTIC est une étude prospective, multicentrique (6 hôpitaux), nationale, non contrôlée, de phase IB/II. Toutes les patientes ont donné leur consentement éclairé par écrit. Conformément à la réglementation française, le protocole d'étude a été approuvé par le comité d'éthique (Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée I) et l'autorité sanitaire française (ANSM) et a été enregistré comme requis (N°EUDRACT 2013-000585-12, NCT01980277). Les détails de cette étude ont été présentés précédemment [10]. En bref, les patientes atteintes d'un CSM HER2-négatif, avec (phase Ib) ou sans (phase II) traitement cytotoxique préalable pour la maladie avancée, étaient éligibles. L'objectif de la phase IB était de déterminer la dose maximale tolérée (DMT) et la dose recommandée en phase 2 (DRP2) de LY2780301 oral (400 ou 500 mg) administrées quotidiennement en combinaison avec le paclitaxel hebdomadaire intraveineux (70 ou 80 mg/m²), tandis que la phase II visait principalement à déterminer l'efficacité de la combinaison, à la fois dans la population globale et chez les patientes ayant une activation de la voie PI3K/AKT/S6 (PI3KAKT+). Le PI3KAKT+ a été défini comme l'identification d'une mutation de *PIK3CA* et/ou *AKT1* par séquençage de nouvelle génération (NGS) ciblé ou la perte homozygote de PTEN par hybridation génomique comparative en réseau (CGHarray) ou par immunohistochimie. L'évaluation tumorale se faisait au cycle 3 jour 1 (C3J1) puis tous les 2 cycles jusqu'à la progression de la maladie ou fin du traitement, en utilisant les critères RECIST 1.1. Dans le cadre de l'étude, des échantillons de sang périphérique ont été prélevés dans quatre tubes EDTA de 5 ml à l'inclusion ou au début du cycle 1 jour 1 (C1J1), à C3J1 (c'est-à-dire après 7 semaines de traitement), et à la progression/fin de traitement.

Étude de l'ADN tumoral circulant plasmatique

Tous les échantillons de plasma ont été conservés à -80°C au Centre de recherche en cancérologie de Marseille (CRCM) après avoir été centrifugés dans les 2 heures suivant le prélèvement sanguin. L'ADN libre circulant (ADNcf) a été extrait du plasma à l'aide de la plateforme Maxwell® RSC Instrument et du Maxwell® RSC circulating cell-free DNA Plasma Kit (Promega™) conformément aux instructions du fabricant. L'ADNcf plasmatique extrait de chaque échantillon a été quantifié par le fluorimètre Qubit (kit d'ADN ds de Qubit HS, ThermoFisher Scientific™).

Dans un premier temps, nous avons analysé l'ADNtc plasmatique en ciblant les anomalies mono-nucléotidiques par ddPCR (droplet digital PCR, BioRad QX200®). Chaque gouttelette était constituée d'ADNcf avec les sondes pour le loci d'intérêt et le milieu réactionnel pour la Polymerase Chain Reaction (PCR). Les sondes qui se fixent sur le variant et celles sur l'ADN non muté portent un fluorochrome différent ce qui permet de les distinguer et de les compter. Nous avons utilisé une quantité d'ADNcf plasmatique de 1ng par expérience. Le monitoring de l'ADNtc plasmatique était basé sur le suivi des mutations hotspot *PIK3CA*, *AKT1* et *TP53* qui avaient été précédemment identifiées sur les échantillons de tumeurs. Chaque point a été analysé au moins sur deux répliques. Les données de ddPCR ont été analysées avec le logiciel d'analyse QuantaSoft (version 1.7.4). Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage, nombre de fraction d'allèles d'ADN mutants cibles par rapport au total d'allèles d'ADN (mutant + type sauvage). Les données issues des répliques ont été combinées pour l'analyse des fractions de variant allélique (VAF) et un minimum de deux gouttelettes positives par allèle muté ont été nécessaires pour obtenir un point positif [23]. (Figure 1)

Dans un second temps, nous avons étudié ces mêmes échantillons, en ciblant les anomalies structurales de l'ADNtc plasmatique, en utilisant une analyse par séquençage du génome entier à faible couverture (*low-coverage whole genome sequencing* ou LC-WGS). (Figure 2)

La constitution des librairies a été réalisée à l'aide d'un kit Diagenode disponible dans le commerce (MicroPlex Library Preparation Kit v2) conformément aux instructions du fabricant. La quantité d'ADNcf plasmatique utilisée était de 5 ng / préparation de librairie. La qualité et la quantité de chaque librairie ont été évaluées respectivement par Agilent 2200 TapeStation system (Agilent HS D1000 Assay kit) et par fluorimètre Qubit (kit Qubit™ dsDNA BR Assay, ThermoFisher Scientific™). Chaque librairie a ensuite été ramenée à 4 nano-molaires avant d'être poolée en quantités équimolaires (12 librairies par mix). Conformément aux instructions du fabricant, tous les mix de librairies ont été séquencés sur un séquenceur de nouvelle génération (NGS), NextSeq500® d'Illumina (San Diego, CA, USA) avec une moyenne de profondeur de couverture de 0,4×, générant des lectures de 2*75 paires de base (pb). Nous avons déterminé pour chaque point une évaluation de la fraction d'ADNcf issu des cellules tumorales (TF, la fraction tumorale). Les reads obtenus à l'issue du séquençage ont été alignés sur le génome de référence humain (hg19) à l'aide du logiciel bwa (version 0.7.15-r1140). L'alignement a ensuite été traité, de façon à enlever les duplicas de séquences avec le logiciel Picard (version 2.9.2). Ensuite, un fichier wig contenant le nombre de reads pour des intervalles réguliers de 50000 bp a été généré avec le logiciel readCounter.

Enfin l'estimation de la fraction d'ADNtc a été obtenue grâce au logiciel ichorCNA (version 0.3.2).

Analyses statistiques

Les critères d'évaluation cliniques étaient l'évaluation de l'ORR, défini comme le pourcentage de patientes ayant obtenu une réponse complète (CR) ou partielle (PR) selon RECIST 1.1 et la SSP, définie comme le temps entre le premier jour du traitement et la progression de la maladie ou le décès. Le temps de participation a ainsi été calculé pour chaque sujet. Tous les sujets vivants à la date de point correspondaient à des données censurées à droite pour la courbe de survie.

Les fréquences ont été utilisées pour décrire les différentes variables qualitatives. Les distributions des variables quantitatives n'étant pas toujours gaussiennes, la description de ces variables a été faite à l'aide de la moyenne mais aussi de la médiane et des valeurs minimales et maximales. Les coefficients de corrélations ont été déterminés par un test de Pearson. La SSP a été estimée selon la méthode de Kaplan-Meier. La comparaison des courbes de survie en fonction des facteurs pronostiques potentiels a été réalisée à l'aide du test du Log Rank. Les analyses de Cox unies et multivariées ont été effectuées pour estimer le rapport des risques avec un intervalle de confiance (IC) de 95 %. Le seuil de signification a été fixé à 5% pour tous les tests utilisés, correspondant à une valeur p significative de $p < 0,05$. L'ensemble des analyses statistiques a été effectué avec le logiciel SAS® Entreprise Guide®.

L'analyse quantitative de l'ADNtc par LC-WGS s'est faite avec l'évaluation de l'ADNtc à l'initiation du traitement, en évaluant la corrélation entre l'absence/présence de l'ADNtc et les critères d'efficacité (SSP et l'ORR) à l'aide d'analyses univariées et multivariées.

Nous avons ensuite évalué les variations de l'ADNtc en calculant un rapport entre la TF mesurée entre deux points temporels. Soit entre le début du traitement (l'inclusion ou la C1J1) et celle à C3J1 (c'est-à-dire après 7 semaines de traitement) ou à la progression/fin de traitement en absence de données à C3J1. L'évolution de la TF entre l'initiation du traitement (P1) et le C3J1 (P2) était calculée comme suit : $(TF_P1 - TF_P2) / TF_P1$. Si nous n'avons pas d'échantillon plasmatique à C3J1 mais qu'un échantillon était disponible à la progression/fin de traitement, le rapport était calculé comme suit : $(TF_P1 - TF_P3) / TF_P1$, (situation rencontrée dans 1 cas). Si la TF à P1 était égale à 0 et positive à P2 ou P3 (en absence de données à P2) (PX), le rapport était calculé comme suit : $(0 - TF_PX) / TF_PX$ et conduisant à un ratio à -1 (ce type de calcul a été utilisé dans 2 cas). Si la TF était égale à 0 à PX, le ratio a été calculé comme suit : TF_P1 / TF_P1 conduisant à un ratio à 1 (ce type de

calcul a été utilisé dans 8 cas). Sur la base de ce rapport, nous avons défini 3 groupes de patientes : Les patientes sans ADNtc détectable entre deux points temporeux ont été classées dans le groupe "ADNtc négatif» (Neg) ; Les patientes avec un ADNtc détectable sur au moins un des deux points temporels ont été divisées en 2 groupes selon la valeur du rapport : ADNtc répondeur (Resp) et ADNtc non-répondeur (NResp).

RESULTATS :

Caractéristiques des patientes

Au total, 12 et 35 patientes ont été inscrites et traitées respectivement dans la partie de la phase IB et la partie de la phase II entre janvier 2014 et juin 2017.

Au moins un échantillon de plasma était disponible chez 43 des 47 patientes (93,5%) avec 31 patientes de phase II (Figure 3). Des échantillons de plasma étaient disponibles au départ, à C3J1 et à progression chez 39 patientes (12 de phase IB et 27 de phase II), 35 patientes (11 de phase IB et 24 de phase II) et 21 patientes (7 de phase IB et 14 de phase II) respectivement. La progression correspondait au C3J1 chez 2 patientes.

Les caractéristiques démographiques des 43 patientes pour lesquelles au moins un échantillon de plasma était disponible, étaient similaires à celles des 47 patientes incluses dans l'essai TAKTIC. Cette cohorte était constituée de femmes dont la moyenne d'âge était de 50,6 ans. La majorité était des carcinomes canaux infiltrants (79%), récepteurs hormonaux (RH) positif (91%). Environ 50% avait ≥ 3 sites métastatiques et 91% avait une atteinte viscérale. Une hormonothérapie et une chimiothérapie dans un contexte métastatique avant inclusion ont été rapportées respectivement chez 28% et 25,6% des patientes. L'efficacité de la combinaison LY2780301-paclitaxel était similaire dans le sous-groupe de 43 patientes par rapport à l'ensemble de la population de l'essai TAKTIC (ORR : 64,28% [49,96%-78,6%] et une SSP médiane de 9 mois [7,49-14,75]). Une activation de la voie PI3K/AKT/S6 a été mise en évidence dans les échantillons de tissus de 19 patientes. Les gènes *PIK3CA* et *AKT1* étaient mutés respectivement dans 12 et 5 cas. Une délétion homozygote de *PTEN* en immunohistochimie était rapportée dans 4 cas. Le gène de *TP53* était muté chez 6 patientes dont 4 étaient associées à une mutation du gène de *PIK3CA* ou *AKT1*. (Tableau 1)

Évaluation pronostique de l'ADNcf initial

Un échantillon de plasma initial était disponible chez 39 patientes. Aucun échec d'extraction de l'ADNcf n'a été rapporté. La concentration moyenne d'ADNcf était de 36,2 ng/ml de plasma (médiane : 9,7 ng/ml de plasma [2,2- 579,6]). Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation significative entre la concentration d'ADNcf à l'inclusion et la SSP, mais il existe une légère tendance, avec un risque relatif de 1,03 [0,995-1,064] $p=0,0928$, par augmentation de 10ng/ml de plasma.

Comparaison des résultats obtenu par technique de LC-WGS et ddPCR

Une analyse par LC-WGS a été effectuée sur 30 des 43 patientes, soit 67 (26+24+17) points temporels différents. Parmi ces 30 patientes, nous avons pu réaliser des analyses par ddPCR chez 10 d'entre elles soit 22 (8+8+6) points temporels différents. (Figure 3) En cas de plusieurs mutations analysées en ddPCR chez une même patiente, la mutation avec la valeur initiale de VAF la plus élevée a été retenue. Les coefficients de corrélation calculés entre les résultats obtenus par LC-WGS et par ddPCR à C1J1, C3J1 et à la progression étaient respectivement de 0.5075 ($p < .0001$), de 0.003 ($p < .0001$) et de 0.7629 ($p < .0001$). Malgré une corrélation faible à C3J1 pouvant être expliquée par le faible nombre de cas où l'analyse par les technologies a pu être réalisée pour ce timepoint, pour la suite des analyses, nous nous sommes limités à corréler les résultats de l'ADNtc obtenu par LC-WGS et les critères d'évaluations cliniques.

Évaluation de l'ADNtc obtenu par LC-WGS

L'analyse d'au moins un échantillon de plasma par LC-WGS était disponible au moment de l'analyse pour 30 des 43 patientes. Les caractéristiques démographiques des patientes sont rapportées dans le tableau 1. Concernant l'analyse du tissu tumoral de ces patientes, une activation de la voie PI3K/AKT/S6 a été rapportée chez 12 d'entre elles (4 délétions de PTEN, et respectivement 4 et 6 mutations du gène *AKT1* et *PIK3CA*). Le gène *TP53* était muté dans 5 cas. Des co-mutations ont été retrouvées dans 3 cas. Aucun échec du séquençage n'a été rapporté.

Un échantillon de plasma initial était présent chez 26 des 30 patientes ayant eu une analyse par LC-WGS. Aucun ADNtc n'a été détecté dans 8 (30,8%) des 26 échantillons plasmatiques initiaux. La fraction tumorale moyenne à C1J1 était de 20,7% (médiane : 18,8% [0-56,89]).

Évaluation pronostique de l'ADNtc initial

Parmi les 26 patients pour lesquels l'analyse de LC-WGS était disponible au départ, la SSP était significativement différente entre les patientes avec et sans ADNtc détectable initialement avec respectivement une médiane de 6,1 mois [5,5-10,2] vs non atteinte [9-NE] avec un Hazard Ratio (HR) de 4,55 [1,44-0,14,3] $p=0,0050$. (Figure 4) Pour la SSP, en analyse multivariée ajustée sur la présence de métastases viscérales et le statut RH positif, la présence d'ADNtc détectable initialement représentait un HR de 4,93 [1,55-15,63] $p=0,0068$. L'ORR n'était pas significativement différent entre les patientes avec et sans ADNtc

déTECTABLE initialement avec respectivement 55% et 37,5%, et un HR de 0,42 [0,07-2,36] $p=0,3248$. (Figure 5)

Évaluation pronostique des variations de l'ADNtc en cours de traitement

D'un point de vue descriptif, dans la majorité des cas où l'on avait les 3 points temporels, nous avons observé une diminution des taux d'ADNtc à C3J1 puis une hausse à la progression. (Figure 6)

Aucun rapport n'a pu être calculé pour 7 patientes, qui ne présentaient qu'un seul point temporel. Nous dénombrons 5 patientes Neg, 15 patientes Resp et 3 patientes NResp. La moyenne de ce rapport était de 0,39 et une médiane de 0,47 [-1 à 1]. La SSP était significativement différente entre les groupes des NResp, des Resp et des Neg avec respectivement une médiane de 4,8 mois [1,6-NE], de 6,1 mois [5,6-12,2] et non atteinte (14,8-NE) donnant un HR de 1,37 [0,30-6,27] et de 0,23 [0,03-1,64] avec $p = 0,0353$.

Une autre analyse a été effectuée en définissant 2 groupes de patientes en fonction de la présence (Detect) ou non (NDetect) d'ADNtc détectable à C3J1. Nous avons des données de LC-WGS à C3J1 pour 24 patientes et des analyses ont pu être menées chez 10 patientes Detect et 9 patientes NDetect. La SSP n'était pas significativement différente mais une tendance entre les NDetect et les Detect a été rapportée, avec respectivement, une médiane de 10,2 mois [5,6-NE] et de 5,9 mois [4,4-19,1] donnant un HR de 1,9 [0,75-4,8], $p = 0,1684$.

DISCUSSION :

Les inhibiteurs PI3K/AKT sont des médicaments prometteurs pour le traitement du CSM et sont apparus avec l'approbation récente de l'alpélisib. La nécessité de mise en évidence de ces altérations mono-nucléotiques, a entraîné le développement de techniques moins invasives comme l'étude par technique NGS de l'ADNtc plasmatique. L'étude de ce dernier pourrait permettre la mise en évidence d'altérations prédictives non seulement de l'efficacité du traitement, mais aussi d'améliorer le suivi du traitement en assurant une identification précoce des non-répondeurs. Dans cette étude ancillaire de l'essai TAKTIC de phase I/II, nous avons utilisé une technique par LC-WGS sur des échantillons plasmatiques prélevés de manière prospective pour confirmer que le taux d'ADNtc initial avait une valeur pronostique sur la SSP et que les variations précoces des taux ADNtc sous traitement étaient corrélées à la SSP.

Dans notre étude, la cohorte ancillaire dénombrait 43 patientes. L'analyse d'au moins un échantillon de plasma par LC-WGS était disponible au moment de l'analyse pour 30 de ces patientes. Nous avons pu détecter de l'ADNtc dans 18 (81,8%) des 26 échantillons plasmatiques initiaux dont nous disposions. Parmi ces 18 patientes, 2 (9,1%) étaient porteuses d'une mutation du gène *PIK3CA*. Dans l'étude de Jacot et al, portant sur 39 patientes, 10 (27,8%) présentaient une mutation du gène *PIK3CA* détectable par ddPCR dans le plasma, avant initiation du traitement [24]. Dans le cancer du pancréas, une étude de phase II randomisée, cherchant à évaluer par NGS (panel de 22 gènes) le caractère pronostique et prédictif de l'ADNtc plasmatique, rapporte une positivité des échantillons initiaux chez 77 des 113 patients testés (68%) [25].

Le LC-WGS est une technique de séquençage nouvellement explorée en oncologie médicale mais ayant fait preuve de concept depuis plusieurs années en gynéco-obstétrique [26]. Les principaux avantages du LC-WGS est qu'il est peu coûteux et souvent pleinement opérationnel dans les laboratoires moléculaires de routine. On peut s'attendre à un délai d'exécution de moins de 4 jours et à un prix total (c'est-à-dire incluant les coûts de traitement) d'environ 200 dollars [27]. Cette technique met en évidence des anomalies structurales de l'ADN ce qui nous permet d'augmenter notre capacité d'identification des tumeurs ayant de nombreuses altérations du nombre de copies mais pas forcément une charge mutationnelle élevée. De plus cette technique reste fiable avec de faibles quantités de concentration d'ADN comme c'est le cas de l'ADNcf plasmatique, à la différence du NGS utilisant un panel élargi. Cette technique présente un large potentiel d'utilisation en oncologie médicale comme par

exemple lors de la phase diagnostique de la maladie (principalement pour les patients fragiles et/ou présentant des lésions difficiles à atteindre) [27], ou à visée pronostique, comme dans notre étude. Des études complémentaires utilisant le LC-WGS permettront d'évaluer le caractère prédictif de la réponse au traitement, de suivi sous traitement et du risque de rechute.

Dans notre étude nous avons pu mettre en évidence le fait que la présence d'ADNtc détectable à l'initiation du traitement était un facteur pronostique négatif pour la SSP. Ce résultat va dans le sens de l'article de l'équipe de Jacot et al, dans lequel la concentration initiale d'ADNcf et la fréquence de mutation de *PIK3CA* plasmatique initiale se sont révélées être significativement associées à la SSP. Comme nous, ils ne rapportent aucune corrélation entre la détection d'ADNtc (mutation *PIK3CA* plasmatique) et la réponse tumorale, quel que soit le point temporel analysé [24]. La valeur pronostique négative de la présence d'ADNtc détectable avant initiation d'un traitement a aussi été décrite dans d'autres cancers [25].

Nous avons pu mettre en évidence une corrélation positive entre la diminution précoce des taux d'ADNtc plasmatique et la SSP. Cela est cohérent avec les résultats de l'étude BEECH où la négativité de l'ADNtc à un mois de traitement était associée de façon significative à la SSP. Dans la cohorte de validation, la médiane de SSP était de 11,1 mois chez les patientes dont d'ADNtc s'était négativé contre 6,4 mois chez les patientes dont l'ADNtc était élevé (HR=0,20, 95% CI 0,083-0,50, P<0,0001), avec des résultats similaires pour les deux groupes d'étude [28]. L'équipe de Jacot et al, rapporte que la persistance de la mutation *PIK3CA* plasmatique, après 1 mois d'hormonothérapie, semble fortement corrélée à une plus mauvaise SSP (SSP à 1 an : 40 % contre 76,7 % ; p = 0,0053) [24]. Des observations similaires ont été faites avec d'autres médicaments, comme les inhibiteurs CDK4/6, utilisés pour le traitement du CSM [29]. L'essai POSEIDON phase Ib, décrit plusieurs cas allant dans le sens de ces essais et de nos observations [30]. D'un point de vue clinique, cela pourrait permettre une modification précoce du traitement pour les patients sans réponse de l'ADNtc. Il convient de noter que cette hypothèse doit être explorée dans le cadre d'essais prospectifs randomisés pour apporter la preuve de son utilité clinique [31].

La corrélation entre la clairance de l'ADNtc et la réponse au traitement peut également être explorée dans des contextes antérieurs. Dans cette étude publiée dans le JAMA oncology, la détection d'ADNtc après une chimiothérapie néo-adjuvante a été associée de manière indépendante à la récurrence de la maladie [32]. Dans une autre étude, de l'ADNtc plasmatique a été détecté avant toute rechute clinique ou radiologique chez 16 des 18

patientes ayant subi une rechute (sensibilité de 89 % et spécificité de 100 %) après un traitement adjuvant pour un cancer du sein [33].

Ce travail présente quelques limites. Premièrement, le fait que l'essai TAKTIC soit une étude à un seul bras, limite sa capacité à différencier la valeur pronostique de l'ADNtc de son impact sur la prédiction de l'efficacité du traitement. Deuxièmement, la taille moyenne de l'échantillon (43 patientes avec des échantillons de plasma disponibles dont seulement 30 ayant eu pour le moment, au moins une analyse par LC-WGS) pourrait avoir réduit la validité statistique de nos résultats. C'est pour cette raison que nous n'avons pas pu réaliser d'analyses par rapport au statut PI3KAKT plasmatique. Des cohortes plus importantes sont donc justifiées pour compléter et confirmer ces données. Ensuite, la comparaison entre les résultats obtenus par LC-WGS et par ddPCR n'a pas pu être faite pour toutes les patientes, car un séquençage par NGS des échantillons tumoraux n'a pas pu être réalisé pour l'ensemble des patientes de la cohorte. De plus, comme nos analyses étaient basées sur des mutations identifiées dans les tissus tumoraux, nous avons peut-être omis certaines altérations circulantes qui n'étaient pas présentes dans l'échantillon de tumeur du fait de l'hétérogénéité intra tumorale et inter tumorale.

En conclusion, la présence ADNtc détectable avant initiation du traitement était corrélée à la survie dans l'essai TAKTIC. La diminution précoce de l'ADNtc plasmatique était un signe avant-coureur de l'efficacité du traitement. Nos résultats suggèrent que la surveillance de l'ADNtc par LC-WGS pourrait, sous réserve d'études complémentaires, être utilisée pour la détection précoce de l'échec du traitement et le choix des thérapies ultérieures.

REFERENCES :

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019;69:7–34. doi:10.3322/caac.21551.
- [2] Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019. doi:10.3322/caac.21565.
- [3] Miller TW, Rexer BN, Garrett JT, Arteaga CL. Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011;13:224. doi:10.1186/bcr3039.
- [4] Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:5049–59. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0632.
- [5] Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, et al. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *J Clin Invest* 2010;120:2406–13. doi:10.1172/JCI41680.
- [6] Robert NJ, Diéras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1252–60. doi:10.1200/JCO.2010.28.0982.
- [7] André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 2019;380:1929–40. doi:10.1056/NEJMoa1813904.
- [8] Azaro A, Rodon J, Calles A, Braña I, Hidalgo M, Lopez-Casas PP, et al. A first-in-human phase I trial of LY2780301, a dual p70 S6 kinase and Akt Inhibitor, in patients with advanced or metastatic cancer. *Invest New Drugs* 2015;33:710–9. doi:10.1007/s10637-015-0241-7.
- [9] Angevin E, Cassier PA, Italiano A, Gonçalves A, Gazzah A, Terret C, et al. Safety, tolerability and antitumour activity of LY2780301 (p70S6K/AKT inhibitor) in combination with gemcitabine in molecularly selected patients with advanced or metastatic cancer: a phase IB dose escalation study. *Eur J Cancer* 2017;83:194–202. doi:10.1016/j.ejca.2017.06.036.
- [10] Vicier, C., Isambert, N., Dalenc, F., Campone, M., Levy, C., Rezai, K., Provansal, M., Adelaide, J., Garnier, S., Guille, A., Chaffanet, M., Popovici, C., Charafe-Jauffret, E., Pakradouni, J., Autret, A., Goncalves, A., 2019. TAKTIC: A prospective, multicenter,

uncontrolled, phase IB/II study of LY2780301 (LY) in combination with weekly paclitaxel (wP) in HER2-negative locally advanced (LA) or metastatic breast cancer (MBC) patients. JCO 37, 1091–1091. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.1091

[11] Oliveira M, Saura C, Nuciforo P, Calvo I, Andersen J, Passos-Coelho JL, et al. FAIRLANE, a double-blind placebo-controlled randomized phase II trial of neoadjuvant ipatasertib plus paclitaxel for early triple-negative breast cancer. Ann Oncol 2019. doi:10.1093/annonc/mdz177.

[12] Kim, S.-B., Dent, R., Im, S.-A., Espi  , M., Blau, S., Tan, A.R., Isakoff, S.J., Oliveira, M., Saura, C., Wongchenko, M.J., Kapp, A.V., Chan, W.Y., Singel, S.M., Maslyar, D.J., Baselga, J., LOTUS investigators, 2017. Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. Lancet Oncol. 18, 1360–1372. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30450-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30450-3)

[13] Schmid, P., Abraham, J., Chan, S., Wheatley, D., Brunt, A.M., Nemsadze, G., Baird, R.D., Park, Y.H., Hall, P.S., Perren, T., Stein, R.C., Mangel, L., Ferrero, J.-M., Phillips, M., Conibear, J., Cortes, J., Foxley, A., de Bruin, E.C., McEwen, R., Stetson, D., Dougherty, B., Sarker, S.-J., Prendergast, A., McLaughlin-Callan, M., Burgess, M., Lawrence, C., Cartwright, H., Mousa, K., Turner, N.C., 2020. Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial. J. Clin. Oncol. 38, 423–433. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00368>

[14] Turner NC, Alarc  n E, Armstrong AC, Philco M, L  pez Chuken YA, Sablin M-P, et al. BEECH: A dose-finding run-in followed by a randomised phase 2 study assessing the efficacy of AKT inhibitor capivasertib (AZD5363) combined with paclitaxel in patients with oestrogen receptor-positive advanced or metastatic breast cancer, and in a PIK3CA mutant sub-population. Ann Oncol 2019. doi:10.1093/annonc/mdz086.

[15] Jones, R.H., Casbard, A., Carucci, M., Cox, C., Butler, R., Alchami, F., Madden, T.-A., Bale, C., Bezecny, P., Joff  , J., Moon, S., Twelves, C., Venkitaraman, R., Waters, S., Foxley, A., Howell, S.J., 2020. Fulvestrant plus capivasertib versus placebo after relapse or progression on an aromatase inhibitor in metastatic, oestrogen receptor-positive breast cancer (FAKTION): a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. Lancet Oncol. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30817-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30817-4)

[16] Siravegna, G., Mussolin, B., Venesio, T., Marsoni, S., Seoane, J., Dive, C., Papadopoulos, N., Kopetz, S., Corcoran, R.B., Siu, L.L., Bardelli, A., 2019. How liquid

biopsies can change clinical practice in oncology. *Ann. Oncol.*
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdz227>

- [17] Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013;368:1199–209. doi:10.1056/NEJMoa1213261.
- [18] Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013;497:108–12. doi:10.1038/nature12065.
- [19] Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 2014;20:548–54. doi:10.1038/nm.3519.
- [20] Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* 2014;20:430–5. doi:10.1038/nm.3511.
- [21] Schwaederle M, Husain H, Fanta PT, Piccioni DE, Kesari S, Schwab RB, et al. Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free (blood) circulating tumor cell DNA assay. *Oncotarget* 2016. doi:10.18632/oncotarget.7110.
- [22] Juric D, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, Iwata H, et al. Alpelisib + fulvestrant for advanced breast cancer: Subgroup analyses from the phase III SOLAR-1 trial. *SABCS 2018, Abstract GS3-08*.
- [23] Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med* 2015;7:302ra133. doi:10.1126/scitranslmed.aab0021.
- [24] Jacot W, Dalenc F, Lopez-Crapez E, Chaltiel L, Durigova A, Gros N, et al. PIK3CA mutations early persistence in cell-free tumor DNA as a negative prognostic factor in metastatic breast cancer patients treated with hormonal therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2019. doi:10.1007/s10549-019-05349-y.
- [25] Bachet, J.-B., Blons, H. F., Hammel, P., El Hariry, I., Portales, F., Mineur, L., et al. Circulating tumor DNA is prognostic and potentially predictive of erasapase efficacy in second-line in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, clincanres.0950.2020. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-0950
- [26] Zhang, H., Gao, Y., Jiang, F., Fu, M., Yuan, Y., Guo, Y., et al. Non-invasive prenatal testing for trisomies 21, 18 and 13: clinical experience from 146 958 pregnancies. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 45(5), 530–538. doi:10.1002/uog.14792

- [27] Raman, L., Van der Linden, M., Van der Eecken, K., Vermaelen, K., Demedts, I., Surmont, V., et al. Shallow whole-genome sequencing of plasma cell-free DNA accurately differentiates small from non-small cell lung carcinoma. *Genome Medicine*, 12(1). doi:10.1186/s13073-020-00735-4
- [28] Hrebien S, Citi V, Garcia-Murillas I, Cutts R, Fenwick K, Kozarewa I, et al. Early ctDNA dynamics as a surrogate for progression free survival in advanced breast cancer in the BEECH trial. *Ann Oncol* 2019. doi:10.1093/annonc/mdz085.
- [29] O’Leary B, Hrebien S, Morden JP, Beaney M, Fribbens C, Huang X, et al. Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nat Commun* 2018;9:896. doi:10.1038/s41467-018-03215-x.
- [30] Baird RD, van Rossum AG, Oliveira M, Beelen KJ, Gao M, Schrier M, et al. POSEIDON phase 1b results: safety, efficacy and ctDNA response of taselisib combined with tamoxifen in hormone receptor positive metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2019. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0508.
- [31] Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol* 2019.
- [32] Radovich, M., Jiang, G., Hancock, B. A., Chitambar, C., Nanda, R., Falkson, C., et al. Association of Circulating Tumor DNA and Circulating Tumor Cells After Neoadjuvant Chemotherapy With Disease Recurrence in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncology*. doi:10.1001/jamaoncol.2020.2295
- [33] Coombes, C., Page, K., Salari, R., Hastings, R. K., Armstrong, A. C., Ahmed, S., ... Shaw, J. A. (2019). Personalized detection of circulating tumor DNA antedates breast cancer metastatic recurrence. *Clinical Cancer Research*, clincanres.3663.2018. doi:10.1158/1078-0432.ccr-18-3663

LEGENDES DES FIGURES :

Figure 1 : Représentation graphique des résultats d'un échantillon plasmatique analysé en droplet digital PCR. Les points en bleu représentent les gouttelettes contenant uniquement des fragments mutés, les gouttelettes vertes uniquement des fragments sauvages, les gouttelettes vertes à la fois les mutés et les sauvages, et les gouttelettes grises ne comprenaient pas la séquence d'ADN recherchée.

Figure 2 : Exemple de profil d'altération du nombre de copie (CNA) (Patiente P1-01001).

A : Profil CNA du tissu tumoral par technique de CHGarray. En rouge les gains et amplifications, en vert les pertes et délétions. On voit clairement une amplification d'un amplicon situé dans la région 10q22 et comprenant le gène *KAT6B*

B : Profil CNA plasmatique par technique de séquençage du génome entier à faible couverture (LC-WGS). On retrouve l'amplification de *KAT6B*

Légende : amp : Amplification du gène ; CGHarray : Hybridation génomique comparative en réseau.

Figure 3 : Flowchart de l'étude.

Légende : LC-WGS : séquençage du génome entier à faible couverture ; ddPCR : droplet digital PCR.

Figure 4 : Courbes de survie sans progression selon la présence ou l'absence d'ADN tumoral circulant plasmatique avant initiation du traitement.

Légende : sWGS : shallow whole genome sequencing; HR : hazard ratio; 95%CI : intervalle de confiance à 95%.

Figure 5 : Représentation graphique du taux de réponse objective (ORR) en fonction de la présence ou l'absence d'ADN tumoral circulant plasmatique avant initiation du traitement.

Légendes : HR : Hazard ratio.

Figure 6 : Exemple de profil d'altération du nombre de copie plasmatique par technique de séquençage du génome entier à faible couverture (LC-WGS) à 3 points temporels différents (Patiente P1-01002).

A : Cycle 1 jour 1

B : Cycle 3 jour 1

C : Progression

D : Variation de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) plasmatique par LC-WGS

E : Variation de l'ADNtc plasmatique en droplet digital PCR (mutation E17K du gène *AKT1*)

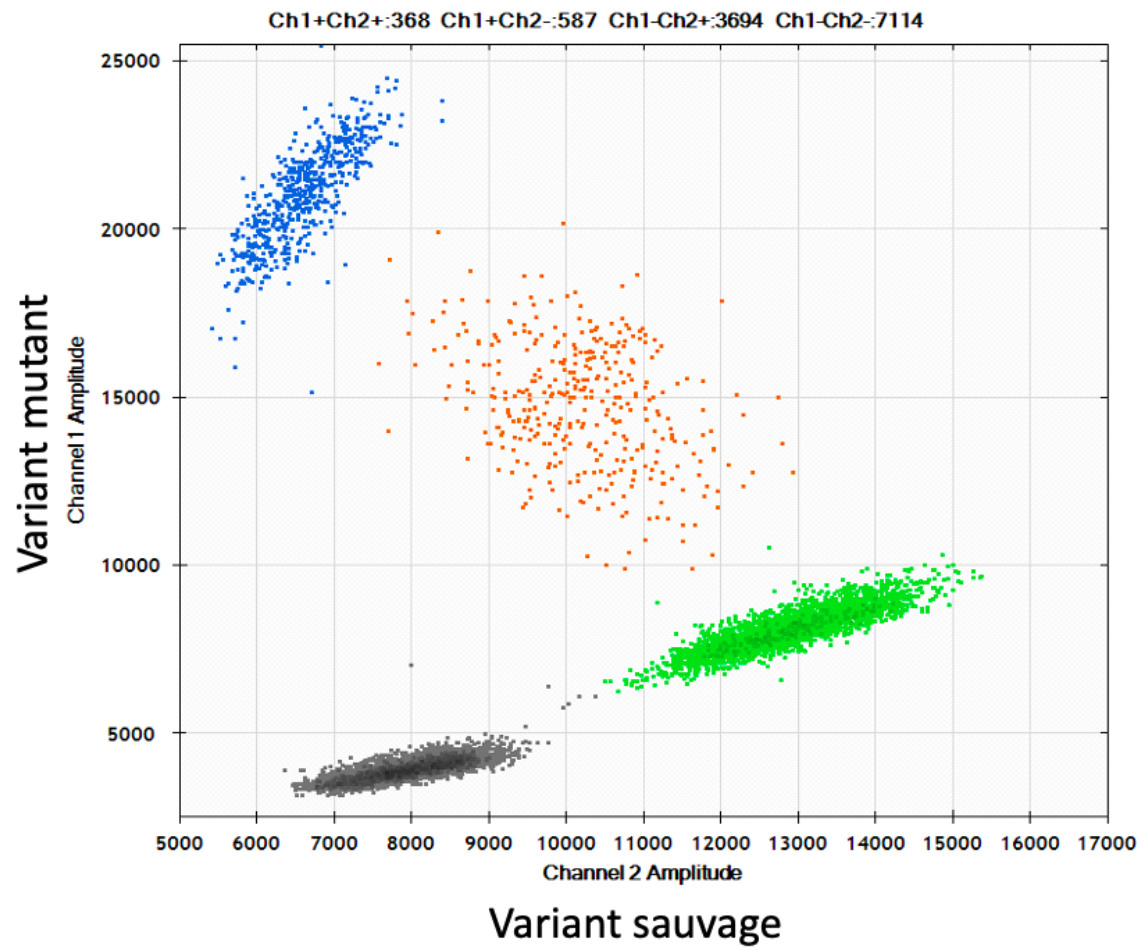
Légende : amp : Amplification.

Tableau 1 : Caractéristiques démographiques

	Cohorte de l'essai TAKTIC	Cohorte de l'étude ancillaire	Cohorte LC-WGS
Nombre de patientes, N(%)	47 (100)	43 (100)	30 (100)
Age médian (ans, intervalle)	51 [29-75]	54 [35-75]	52 [35-75]
Histologie, N(%)			
• Adénocarcinome canalaire infiltrant	39 (90)	34 (79)	22 (73,4)
• Autres	5 (10,6)	5 (11,6)	4 (13,3)
• Données manquantes	3 (6,4)	4 (9,4)	4 (13,3)
Statut récepteur hormonal (RH), N(%)			
• Négatif	4 (8,51)	4 (9,3)	3 (10)
• Positif	43 (91,49)	39 (90,7)	27 (90)
Stade de la maladie à l'inclusion, N(%)			
• Localement avancée	0	0	0
• Métastatique	47 (100,0)	43 (100,0)	30 (100,0)
Sites métastatiques, N(%)			
• Viscéral	42 (89,36)	39 (90,7)	29 (96,7)
• Non viscéral	5 (10,64)	4 (9,3)	1 (3,33)
Nombre de sites métastatiques, N(%)			
• 1	7 (14,89)	7 (16,28)	6 (20)
• 2	16 (34,04)	15 (34,88)	10 (33,3)
• ≥3	24 (51,06)	21 (48,8)	14 (46,7)
Traitement de la maladie à un stade métastatique avant inclusion, N(%)			
• Chimiothérapie	11 (23,40)	11 (25,6)	11 (36,6)
• Hormonothérapie	12 (25,53)	12 (27,9)	11 (36,6)
Nombre de ligne de Chimiothérapie à un stade métastatique avant inclusion, N(%)			
• Première ligne	2 (4,25)	2 (4,6)	2 (6,6)
• Deuxième ligne et plus	9 (19,1)	9 (20,9)	9 (30)
Activation de la voie PI3K/AKT, N(%)			
• PI3KAKT+	19 (40,43)	19 (44,2)	12 (40)
• PIKAKT-	28 (59,57)	24 (55,8)	18 (60)
Mutation du gène <i>PI3KCA</i>, N(%)			
• Oui	12 (30,77)	12 (28)	6 (20)
• Non	27 (69,23)	31 (72)	24 (80)
• Données manquantes	8	0	0
Mutation du gène <i>AKT1</i>, N(%)			
• Oui	5 (12,82)	5 (11,6)	4 (13,3)
• Non	34 (87,18)	38 (88,4)	26 (86,7)
• Données manquantes	8	0	0
Expression de PTEN en IHC, N(%)			
• Oui	34 (89,47)	39 (90,7)	26 (86,7)
• Non	4 (10,53)	4 (9,3)	4 (13,3)
• Données manquantes	9	0	0

Légende : % : Pourcentage ; IHC : Immunohistochimie ; LC-WGS : Séquençage du génome entier à faible couverture.

Figure 1 :



A:

B :

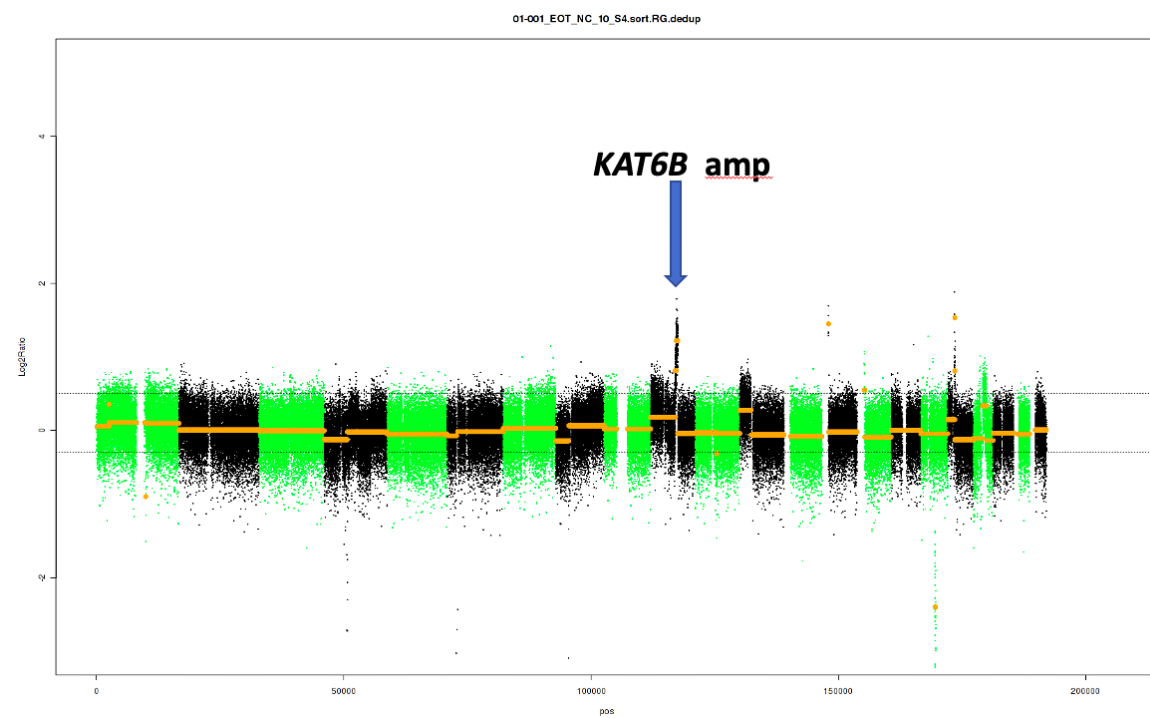


Figure 3 :

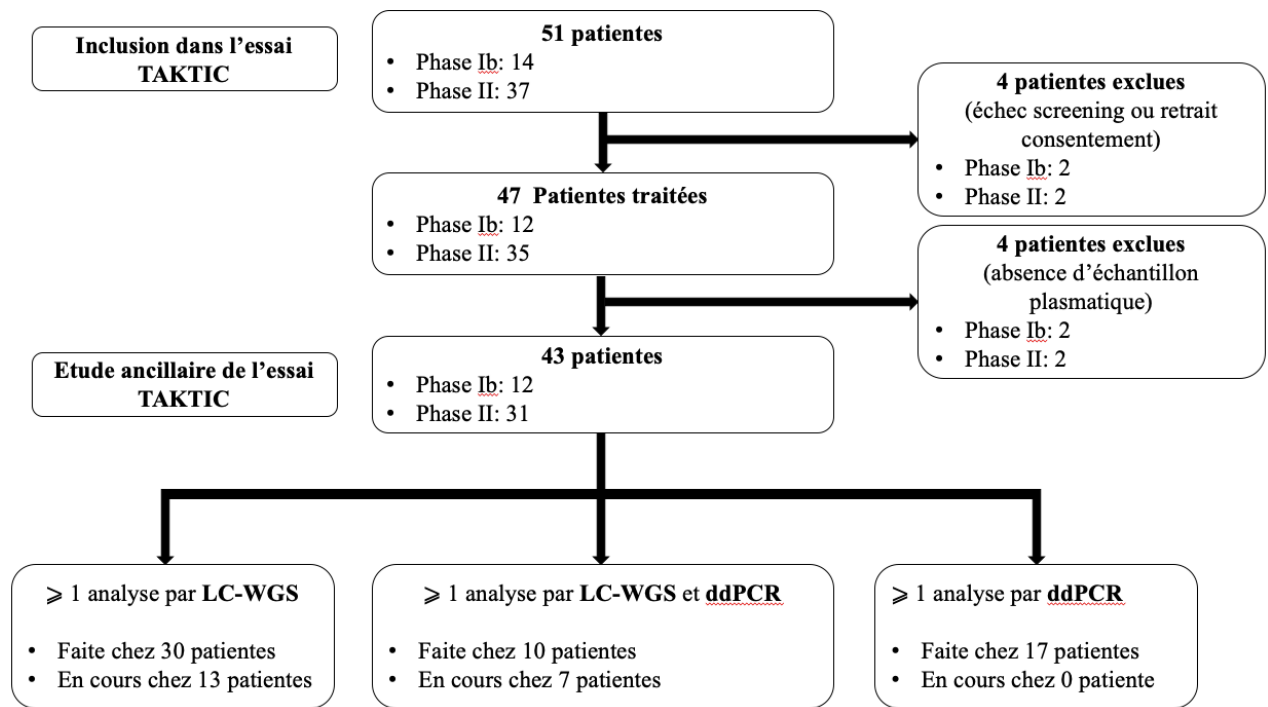


Figure 4 :

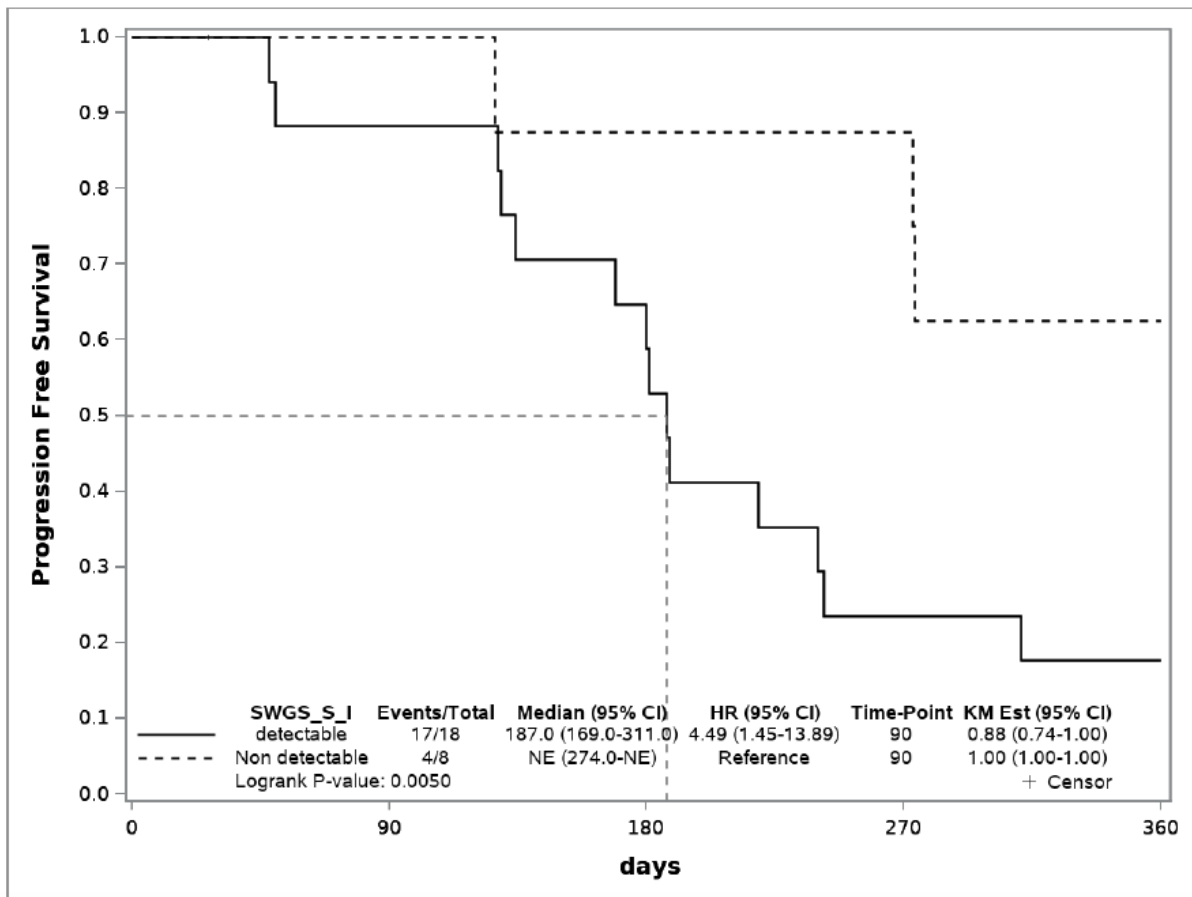


Figure 5 :

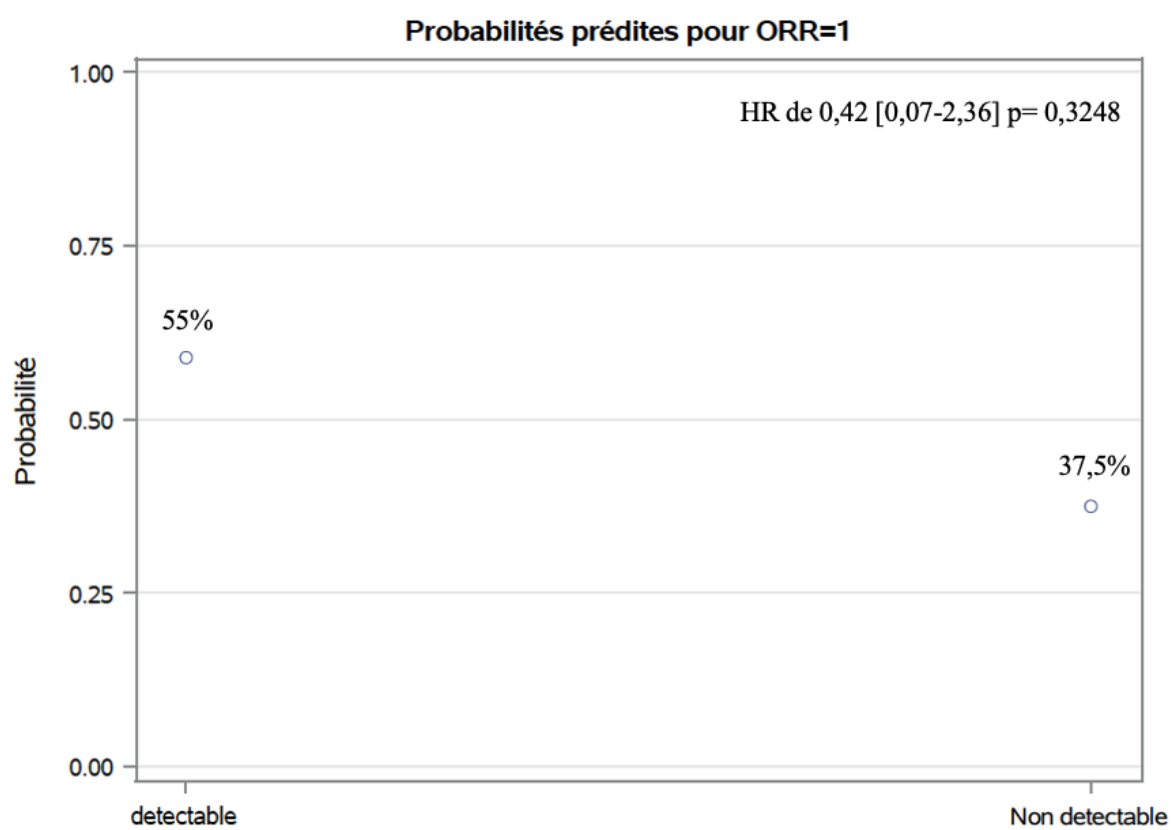
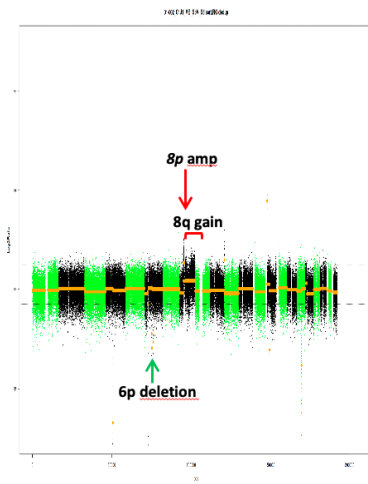
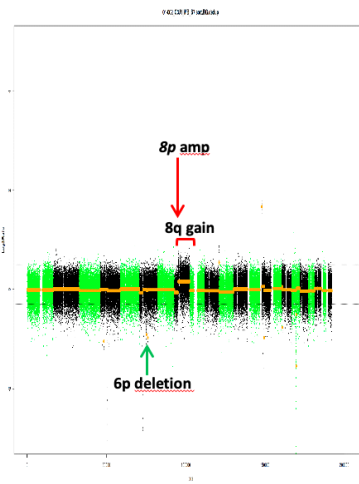


Figure 6 :

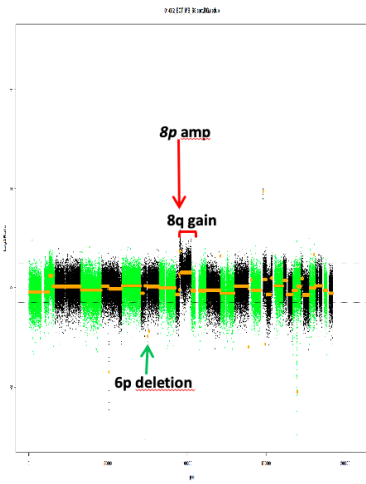
A :



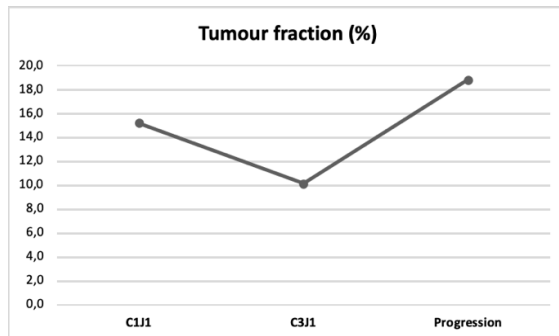
B :



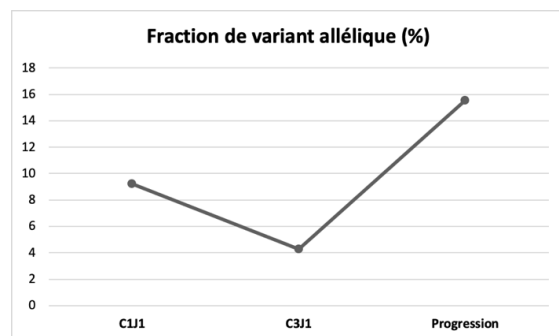
C :



D :



E :



Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.