



HAL
open science

**Caractérisation de l'hétérogénéité génétique
intra-tumorale spatiale et temporelle des carcinomes
épidermoïdes de la tête et du cou par séquençage
multirégional des tumeurs primitives et analyses
comparées des récurrences et des tissus avant et après
thérapie ciblée**

Grégoire Marret

► **To cite this version:**

Grégoire Marret. Caractérisation de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale spatiale et temporelle des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou par séquençage multirégional des tumeurs primitives et analyses comparées des récurrences et des tissus avant et après thérapie ciblée. Cancer. Université Paris sciences et lettres, 2023. Français. NNT : 2023UPSLS053 . tel-04696319

HAL Id: tel-04696319

<https://theses.hal.science/tel-04696319v1>

Submitted on 13 Sep 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Institut Curie

Unité de Pharmacogénomique, Département de Génétique

Caractérisation de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale spatiale et temporelle des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou par séquençage multirégional des tumeurs primitives et analyses comparées des récurrences et des tissus avant et après thérapie ciblée

Soutenue par

Grégoire MARRET

Le 24 novembre 2023

École doctorale n° 582

**Cancérologie, Biologie,
Médecine, Santé**

Spécialité

**Sciences de la vie et de la
santé**

Confidentiel jusqu'au 24 mai 2024

Composition du jury :

Haïtham, MIRGHANI Professeur, Hôpital Européen Georges Pompidou	<i>Président, Rapporteur</i>
Sandrine, FAIVRE Professeure, Hôpital Saint-Louis	<i>Rapporteuse</i>
Eric, PASMANT Professeur, Hôpital Cochin	<i>Examineur</i>
Hélène, BLONS Professeure, Hôpital Européen Georges Pompidou	<i>Examinatrice</i>
Laurence, CALZONE Ingénieure de Recherche, Institut Curie	<i>Examinatrice</i>
Maud, KAMAL Manager scientifique, Institut Curie	<i>Examinatrice</i>
Ivan, BIECHE Professeur, Institut Curie	<i>Directeur de thèse</i>
Christophe, LE TOURNEAU Professeur, Institut Curie	<i>Co-Directeur de thèse</i>

Résumé en français

Les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (CETC) sont la septième cause de cancer dans le monde. En situation de récurrence et/ou métastatique, le pronostic des patients est sombre avec une médiane de survie d'une année en l'absence de traitement. Le cetuximab, un anticorps monoclonal ciblant l'EGFR, est la seule thérapie ciblée approuvée dont l'efficacité en monothérapie reste marginale en l'absence de biomarqueurs disponibles. Les altérations (épi)génétiques qui s'accumulent diversement dans les cellules malignes génèrent des sous-clones évoluant dans des niches géographiques distinctes (à l'origine d'une hétérogénéité intra-tumorale spatiale) et dont l'importance relative évolue au cours du temps sous la pression de sélection naturelle et thérapeutique (à l'origine d'une hétérogénéité intra-tumorale temporelle). Les études disponibles dans les CETC s'accordent sur l'omniprésence d'une hétérogénéité génétique intra-tumorale dont l'importance semble corrélée à une diminution de la survie globale et à une augmentation du risque d'évolution métastatique. Ces données établies majoritairement sur l'analyse d'une seule biopsie sous-estiment la part d'hétérogénéité spatiale et temporelle d'une tumeur.

Les objectifs de cette thèse étaient les suivants : (i) caractériser l'hétérogénéité génétique spatiale des CETC localisés, (ii) caractériser l'hétérogénéité temporelle qui émerge au cours de la récurrence tumorale représentée par l'ADN tumoral circulant (ctDNA) et sous thérapie ciblée et (iii) préciser la valeur pronostique de l'hétérogénéité intra-tumorale spatiale dans les CETC localisés et d'une maladie résiduelle minimale basée sur la détection du ctDNA dans les CETC opérés.

Nous avons validé la faisabilité d'un séquençage multirégional du génome et du transcriptome d'une tumeur primitive guidé par l'annotation spatiale de ses régions histologiquement peu et bien différenciées. Un score d'hétérogénéité pathologique était calculé pour chaque patient corrélant significativement à des profils d'expression différentielle de gènes impliqués dans les voies de signalisation de la jonction cellulaire. Nous avons rapporté une hétérogénéité génomique chez 37% des patients suivis pour un CETC localisé. Nous montrons que la présence d'une hétérogénéité spatiale a des implications thérapeutiques puisque 32% d'entre eux auraient bénéficié d'une thérapie ciblée différente suivant la région tumorale biopsiée. L'analyse comparée des génomes des tumeurs primitives et des ctDNA prélevés de façon répétée a conforté l'existence d'une hétérogénéité spatiale chez 14% des patients suivis pour un CETC initialement localisé et a montré l'émergence de nouvelles mutations au cours du

temps dans 43% des cas. Les mutations détectées dans le plasma et impliquées dans l'hétérogénéité intra-tumorale étaient pour la plupart actionnables suggérant l'applicabilité du ctDNA à la médecine de précision. Nous montrons que le ctDNA est un biomarqueur de maladie résiduelle minimale dont la détection postopératoire corrèle à une augmentation du risque de récurrence.

Nos travaux ont identifié des biomarqueurs pharmacodynamiques de l'activité de l'afatinib (un inhibiteur de tyrosine kinase pan-HER) administré en préopératoire dans des CETC localisés. Ces biomarqueurs étaient définis au niveau cellulaire par des changements de la composition du micro-environnement tumoral en lymphocytes B et au niveau moléculaire par l'activité de la voie de signalisation NF- κ B.

En définitive, les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont permis de caractériser l'importance de l'hétérogénéité génétique qui existe dans des CETC localisés et émergent au cours de la progression tumorale et sous traitement, d'en appréhender l'impact en termes de médecine de précision et d'en préciser les déterminants moléculaires et cellulaires concourants à l'identification de nouveaux biomarqueurs tissulaires et circulants.

Remerciements

J'aimerais adresser mes premiers remerciements à mes directeurs de thèse, les Professeurs Ivan Bièche et Christophe Le Tourneau. Je mesure la chance inouïe que j'ai eue de pouvoir apprendre et évoluer à vos côtés. J'ai pu trouver dans nos échanges une grande source d'inspiration et de motivation. Vous n'avez pas hésité à m'accorder votre confiance et à me confier des projets scientifiques d'envergures. Merci d'avoir cru en moi.

Je remercie très chaleureusement Maud qui m'a initié avec beaucoup de patience, de bienveillance et de pédagogie à la recherche. Tu as tout rendu possible en donnant sans compter.

Je remercie Constance, Maral et Célia pour leur soutien tout au long de ces années de thèse. J'ai pu découvrir au sein de la Cellule de Coordination Scientifique du D3i des personnes hors du commun généreuses et attentionnées. Tout est plus simple grâce à vous.

Je remercie tous les membres de l'UIC, ma seconde famille à l'Institut Curie.

Je tiens enfin à remercier les membres de mon jury de thèse. Je remercie le Professeur Haïtham Mirghani pour avoir accepté de présider mon jury et qui m'a fait l'honneur de juger mes travaux. Je remercie le Professeur Sandrine Faivre qui m'a fait l'honneur de juger mes travaux. Je remercie le Professeur Hélène Blons, le Professeur Eric Pasmant et Madame Laurence Calzone qui ont accepté de participer à ce jury.

À Laura

Table des matières

Résumé en français	i
Remerciements	iii
Table des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xii
Liste des algorithmes	xiii
Liste des abréviations	xiv
1 Première partie	1
1.1 Déterminants de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale	1
1.1.1 Approche historique de l'évolution et de l'hétérogénéité du cancer	1
1.1.2 Approche réductionniste du cancer	3
1.1.3 Complexité de l'évolution et de l'hétérogénéité intra-tumorale	3
1.1.4 Évolution ramifiée ou linéaire, contraintes et interactions clonales	4
1.1.5 Évolution neutre	5
1.1.6 Ponctualisme et macroévolution	6
1.1.7 Limites des modèles évolutifs et illusion de la clonalité	7
1.1.8 Mutations	9
1.1.8.1 Instabilité génétique	9
1.1.8.2 Hallmarks d'instabilité génétique	9
1.1.9 Sélection	10
1.1.9.1 Sélection des clones métastatiques	11
1.1.9.2 Sélection des clones sous traitement	12
1.1.10 Déterminants non génétiques de l'hétérogénéité intra-tumorale	12
1.1.10.1 Micro-environnement tumoral	12
1.1.10.2 Plasticité cellulaire	13
1.2 Méthodes de caractérisation de l'hétérogénéité intra-tumorale	14
1.2.1 Principe de la déconvolution clonale	14
1.2.2 Estimation des fractions mutationnelles	16
1.2.3 Utilisation des variants ponctuels pour la déconvolution clonale	18
1.2.4 Utilisation des CNV pour la déconvolution clonale	21
1.2.4.1 Étude des déséquilibres alléliques	21

1.2.4.2	Déconvolution clonale avec FACETS	24
1.2.5	Principes phylogénétiques appliqués à la déconvolution clonale	28
1.2.6	Apport des prélèvements multiples pour appréhender l'hétérogénéité tumorale	30
1.2.6.1	Travaux fondateurs sur les cancers du rein à cellules claires	31
1.2.6.2	Approche de séquençage multirégional dans TRACERx Lung	34
1.2.6.3	Approche de séquençage multirégional dans TRACERx Renal	35
1.2.7	Séquençage sur cellules individuelles	36
1.2.8	Apport de l'ADN tumoral circulant pour traquer l'évolution clonale	39
1.3	Impact clinique de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale	43
1.3.1	Caractérisation pronostique de l'hétérogénéité intra-tumorale dans TRACERx	43
1.3.1.1	Résultats de TRACERx Lung	43
1.3.1.2	Résultats de TRACERx Renal	44
1.3.2	Impact pronostique de l'instabilité chromosomique	46
1.3.3	Impact de l'hétérogénéité intra-tumorale sur la médecine de précision	48
1.4	Hétérogénéité génétique intra-tumorale des cancers de la tête et du cou	51
1.4.1	Généralités sur les cancers de la tête et du cou	51
1.4.1.1	Épidémiologie	51
1.4.1.2	Panorama moléculaire	52
1.4.1.3	Stratification pronostique	53
1.4.1.4	Thérapies ciblées et biomarqueurs théranostiques	53
1.4.1.5	Immunothérapie	55
1.4.2	Méthode utilisée pour la revue de la littérature	56
1.4.3	Hétérogénéité génétique mesurée par dispersion des fréquences alléliques	56
1.4.4	Hétérogénéité génétique estimée par déconvolution clonale	60
1.4.4.1	Séquençage d'une seule biopsie	62
1.4.4.2	Approche de séquençage multirégional	65
1.4.4.3	Approche de séquençage sur cellules individuelles	68
2	Deuxième partie	70
2.1	Contexte général de la thèse de sciences	70
2.2	Hypothèses et objectifs	71
3	Troisième partie	73
3.1	Résultats sur l'hétérogénéité intra-tumorale spatiale	73

3.1.1	Introduction	73
3.1.2	Étude SCANDARE	74
3.1.3	Hétérogénéité histologique intra-tumorale	76
3.1.3.1	Matériel et méthodes	76
3.1.3.2	Résultats	77
3.1.4	Hétérogénéité génétique intra-tumorale	79
3.1.4.1	Matériel et méthodes	79
3.1.4.2	Résultats	81
3.1.5	Hétérogénéité transcriptomique intra-tumorale	83
3.1.5.1	Matériel et méthodes	83
3.1.5.2	Résultats	84
3.1.6	Discussion	89
3.1.7	Perspectives et publications	90
3.2	Résultats sur l'hétérogénéité intra-tumorale temporelle à récurrence	91
3.2.1	Introduction	91
3.2.2	Article #1 <i>Addressing molecular relapse and intra-tumor heterogeneity in head and neck cancer with circulating tumor DNA</i>	93
3.2.3	Discussion	131
3.2.4	Perspectives et publications	132
3.3	Résultats sur l'hétérogénéité intra-tumorale temporelle sous afatinib	132
3.3.1	Introduction	132
3.3.2	Article #2 <i>Randomized phase II study of preoperative Afatinib in untreated head and neck cancers: predictive and pharmacodynamic biomarkers of efficacy</i>	134
3.3.3	Discussion	170
3.3.4	Perspectives et publications	171
3.4	Conclusion générale	171
4	Annexes	173
4.1	Articles connexes et abstracts	173
4.1.1	Article #3 <i>Genomic Alterations in head and neck squamous cell carcinoma: level of evidence according to ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT)</i>	173

4.1.2	Article #4 <i>Window-of-opportunity clinical trials for biomarker discovery in head and neck squamous cell carcinoma</i>	187
4.1.3	AACR 2023, Abstract #3363 <i>Spatial and longitudinal tumor heterogeneity in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with primary surgery</i>	197
4.1.4	ESMO 2023, Abstract #2773 <i>Prognostic value of pathological intratumor heterogeneity in patients with head and neck squamous cell carcinoma treated with upfront surgery</i>	199
4.1.5	ESMO 2023, Abstract #2547 <i>Serial cell-free tumor DNA in prognosing survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma treated with upfront surgery</i>	201
4.2	Bibliographie	203

Liste des figures

Figure 1.1-1 Modèle d'expansion clonale dans les hémopathies et les cancers solides.	2
Figure 1.1-2 Modèle d'évolution darwinienne du cancer.	4
Figure 1.1-3 Complexité des modèles évolutifs.	6
Figure 1.1-4 Un cancer est déterminé par une succession de processus évolutifs.	8
Figure 1.1-5 Illusion de la clonalité.	8
Figure 1.1-6 Modèle linéaire et dissémination précoce des métastases.	12
Figure 1.2-1 Séquençage des tissus ou des cellules individuelles.	14
Figure 1.2-2 Déconvolution clonale des données de <i>bulk sequencing</i> .	15
Figure 1.2-3 Variation des VAF en fonction des CNV et de la cellularité tumorale.	17
Figure 1.2-4 Profils de CNV illustrant une LOH à copie neutre.	22
Figure 1.2-5 Variation des BAF selon différentes variables.	24
Figure 1.2-6 <i>Workflow</i> des analyses FACETS.	25
Figure 1.2-7 Sortie de logiciel FACETS.	27
Figure 1.2-8 Densité de Kernel des CCF.	28
Figure 1.2-9 Principes phylogénétiques.	29
Figure 1.2-10 Déséquilibre allélique en miroir et inférence clonale.	30
Figure 1.2-11 <i>Workflow</i> des analyses sur l'hétérogénéité génétique par séquençage multirégional dans le cancer du rein à cellules claires.	32
Figure 1.2-12 Hétérogénéité génétique d'un cancer du rein à cellules claires.	33
Figure 1.2-13 <i>Workflow</i> des analyses de déconvolution clonale et d'inférence phylogénétique par séquençage multirégional dans TRACERx Lung.	35

Figure 1.2-14 Analyse comparée des mutations ponctuelles et des CNV dans les cancers du rein à cellules claires selon différentes études incluant TRACERx Renal.	36
Figure 1.2-15 Séquençage sur cellules individuelles dans un cancer du sein triple négatif.	38
Figure 1.2-16 <i>Workflow</i> des analyses d'inférence phylogénétique des récidives par séquençage de l'ADN tumoral circulant dans TRACERx Lung.	40
Figure 1.2-17 Séquençage ciblé des ctDNA sériés dans TRACERx Lung.	41
Figure 1.2-18 Evolution clonale à progression capturée par séquençage ciblé du ctDNA dans TRACERx Lung.	42
Figure 1.3-1 Impact pronostique de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale sur la survie sans progression dans TRACERx Lung.	44
Figure 1.3-2 Caractérisation pronostique de sept trajectoires évolutives établies chez 63 patients de la cohorte TRACERx Renal.	45
Figure 1.3-3 Impact pronostique de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale dans TRACERx Renal.	46
Figure 1.3-4 Théorie de l'effondrement mutationnel appliquée au cancer.	48
Figure 1.3-5 Modèles d'évolution clonale sous la pression thérapeutique.	50
Figure 1.4-1 Données de séquençage <i>whole-exome</i> de 279 carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou de la cohorte TCGA, Nature 2015.	52
Figure 1.4-2 Mesure de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale par analyse de dispersion des fréquences alléliques (MATH).	58
Figure 1.4-3 Hétérogénéité génétique à progression dans les cancers tête et cou par l'étude comparée des tumeurs primitives et des métastases.	63
Figure 1.4-4 Evolution ramifiée et équilibre ponctué au cours de l'évolution métastatique dans les cancers tête et cou.	64
Figure 1.4-5 Inférence phylogénétique et chronologie des évènements clonaux par séquençage multirégional d'une tumeur de l'oropharynx.	65

Figure 1.4-6 Inférence phylogénétique par séquençage multirégional de dix tumeurs primitives de la cavité orale.	67
Figure 1.4-7 Inférence phylogénétique par séquençage multirégional de cinq tumeurs primitives de la cavité orale.	68
Figure 3.1-1 <i>Workflow</i> de l'étude SCANDARE pour les cancers de la tête et du cou.	75
Figure 3.1-2 Diagramme en forêt des risques instantanés relatifs de récurrence chez 88 patients SCANDARE pour plusieurs variables clinicopathologiques.	79
Figure 3.1-3 <i>Flowchart</i> des patients SCANDARE pour l'analyse de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale.	81
Figure 3.1-4 Oncoprint réalisé sur 21 patients SCANDARE (71 régions au total) avec une hétérogénéité génétique intra-tumorale.	82
Figure 3.1-5 Oncoprint réalisé sur sept patients SCANDARE (23 régions au total) avec une hétérogénéité génétique intra-tumorale actionnable.	83
Figure 3.1-6 Pourcentage d'inertie des axes de l'ACP (78 patients) et gènes contributifs.	85
Figure 3.1-7 ACP rendues pour 78 patients et 197 régions tumorales.	88
Figure 3.1-8 Analyses par regroupement hiérarchique rendues pour 78 patients selon le sous-type tumoral (A), le score d'hétérogénéité pathologique (B) et le statut HPV 16 (C).	89

Liste des tableaux

Tableau 1-1 Études sur l'hétérogénéité génétique des CETC par estimation de la MATH.	59
Tableau 1-2 Études sur l'hétérogénéité génétique des CETC par déconvolution clonale.	61
Tableau 3-1 Caractéristiques clinicopathologiques de 88 patients SCANDARE.	78
Tableau 3-2 Analyses d'enrichissement des gènes contributifs de l'ACP.	86

Liste des algorithmes

Algorithme 1.2-1 Plusieurs réalisations d'un processus de Dirichlet selon différents paramètres d'échelle α pour une distribution de base normale centrée réduite. 20

Liste des abréviations

ACP Analyse en composante principale
BAF Fréquence de l'allèle B
CBNPC Cancer bronchique non à petites cellules
CCF Fraction d'une cellule cancéreuse
CETC Carcinome épidermoïde de la tête et du cou
CNV Variation de nombre de copies
CP Prévalence cellulaire
CPS *Combined Positive Score*
cRCC Cancer du rein à cellules claires
ctDNA ADN tumoral circulant
DP Processus de Dirichlet
HPV Papillomavirus humain
HR *Hazard Ratio*
IC Intervalle de confiance
InDel Insertion/délétion
KEGG *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LOH Perte d'hétérozygotie
MATH *Mutant-Allele Tumor Heterogeneity*
MSI Instabilité des microsatellites
NGS Séquençage massivement parallèle
p-EMT Programme partiel de transition épithélio-mésenchymateuse
RFS Survie sans récurrence
SCA Séquençage sur cellules individuelles
SNP Polymorphisme nucléotidique
SNV Substitution nucléotidique
TCGA *The Cancer Genome Atlas*
TILs Infiltrat tumoral lymphocytaire
TMB Charge mutationnelle tumorale
VAF Fréquence allélique d'un variant
wGII *weighted Genome Instability Index*

1 Première partie

1.1 Déterminants de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale

1.1.1 Approche historique de l'évolution et de l'hétérogénéité du cancer

La théorie de l'évolution suggère que toutes les espèces vivantes sont en perpétuelle transformation et subissent au fil du temps et des générations des modifications morphologiques comme génétiques. Ce concept a été présenté par Charles Darwin en 1859 dans son ouvrage *L'origine des espèces*. Depuis, il a bouleversé la biologie en fournissant la pièce clé pour expliquer l'instabilité et les variations du vivant. Selon sa théorie, l'évolution peut permettre sur des échelles de temps plus ou moins longues l'apparition de nouvelles espèces comme la disparition d'autres à travers différents phénomènes dont la sélection naturelle, l'hérédité et la variation.

En partant du constat qu'une tumeur est hétérogène, Peter Nowell a émis l'hypothèse que le développement du cancer est également un phénomène évolutif soumis à des principes darwiniens où des clones cellulaires avantageés sont sélectionnés (Figure 1.1-1)¹. Lorsque Bert Vogelstein décrit en 1990 la succession des mutations nécessaires pour engendrer un cancer colorectal, il procède à la traduction en termes génétique de l'évolution². En somme, un cancer constitué est le résultat d'une pluralité de causes³ :

- Des altérations génétiques aléatoires ;
- L'action déterministe de la sélection naturelle. Elle procède au tri des meilleurs génotypes sur la base de leur phénotype. Cette participation différentielle des génotypes modifie la fréquence des mutations et va donc faire évoluer la structure génétique des cellules cancéreuses au fil des générations⁴ ;
- Une dérive génétique aléatoire. Elle contribue à l'évolution des cellules cancéreuses en rapport avec des événements aléatoires indépendants des mutations et de la sélection naturelle.

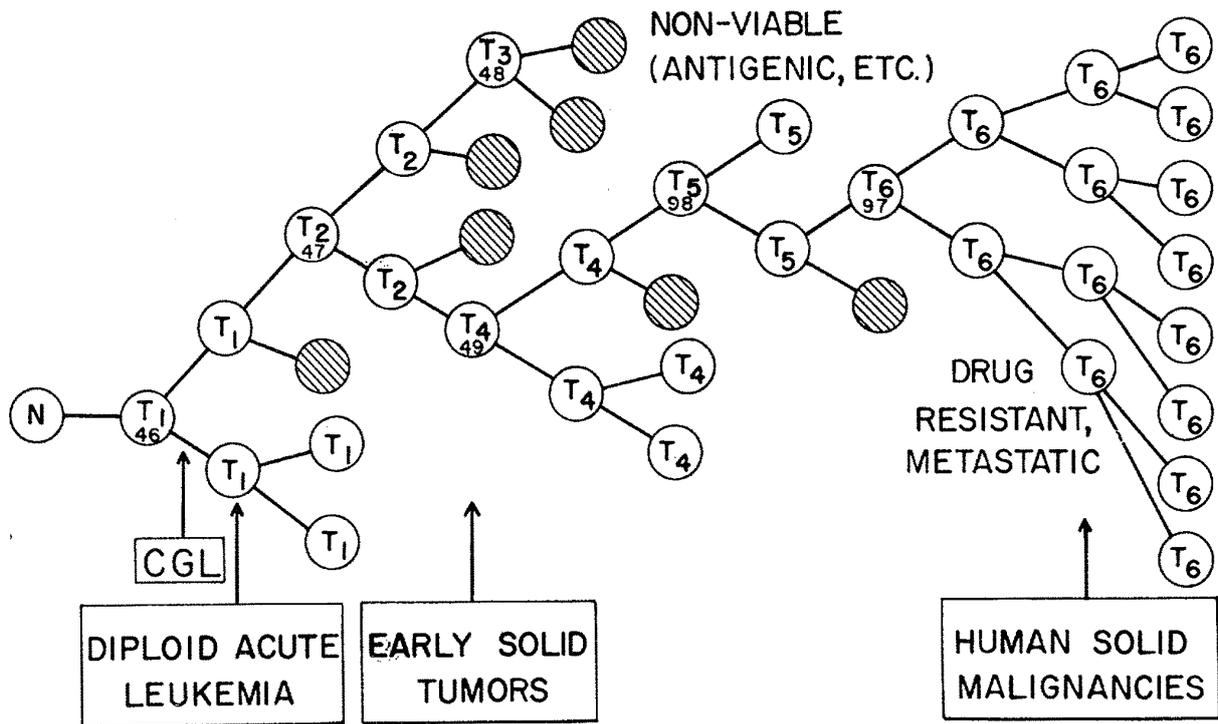


Figure 1.1-1 Modèle d'expansion clonale dans les hémopathies et les cancers solides.

D'après Nowell¹.

L'hétérogénéité qui existe dans une tumeur est familière au pathologiste. Sous le microscope, les cellules malignes se caractérisent par une diversité morphologique et une variabilité d'expression de marqueurs moléculaires⁵. La question que posent ces observations est : cette hétérogénéité reflète-t-elle la capacité des cellules à s'engager partiellement dans un processus de différenciation, ou traduit-elle la présence de sous-populations différant par leurs altérations génétiques et épigénétiques ? Grâce aux progrès de la génomique, en particulier des techniques de séquençage massivement parallèle (NGS), l'existence d'une hétérogénéité génétique intra-tumorale a pu être mise en évidence confortant une vision évolutive du cancer⁶.

Les mutations qui s'accroissent diversement dans les cellules combinées au processus continu de sélection donnent naissance à des populations génétiquement distinctes (ou *clones*), chacune avec sa propre distribution topographique à l'origine d'une hétérogénéité spatiale^{7,8}. Une tumeur peut alors être perçue comme un ensemble dynamique de populations cellulaires en voie de transformation ou déjà transformée dont une population numériquement majoritaire correspondant à celle en phase de dominance clonale. Leur proportion relative varie au cours du temps à l'origine d'une hétérogénéité temporelle. L'hétérogénéité génétique intra-tumorale

est finalement façonnée par un équilibre dynamique entre les sous-clones, l'environnement tissulaire, la pression thérapeutique et la sélection naturelle.

1.1.2 Approche réductionniste du cancer

L'approche réductionniste attribue l'émergence d'une tumeur et son évolution aux mutations⁹. Cette émergence est la conséquence d'altérations de l'ADN dans une cellule primordiale (variations ponctuelles et structurelles du génome, modifications de l'épigénome) lui conférant un avantage compétitif en termes de survie et de prolifération dans un environnement donné. Ces mutations ont un effet oncogénique (également appelé *driver*). À l'opposé, d'autres mutations ont un effet neutre (c'est à dire ni positif, ni délétère) sur la cellule^{10,11}.

Les mutations présentes dans toutes les cellules tumorales sont clonales. Lorsqu'elles sont présentes dans une fraction des cellules tumorales, elles sont sous-clonales¹². Cette diversité génétique et son évolution au cours du temps sont à l'origine de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale gouvernée par les caractéristiques de la cellule primordiale, la nature des gènes altérés, le micro-environnement tumoral et la pression thérapeutique.

1.1.3 Complexité de l'évolution et de l'hétérogénéité intra-tumorale

Dans une vision darwinienne de l'évolution, le cancer évolue en accumulant aléatoirement des mutations et en sélectionnant les cellules qui se multiplient le plus rapidement dans un environnement donné (Figure 1.1-2)^{13,14}. Dans le modèle de Nowell, l'évolution est aléatoire et gouvernée par la sélection naturelle. Dans le modèle de Vogelstein, la transformation maligne oriente l'évolution¹⁵.

Des données récentes de NGS viennent compléter ces modèles historiques et enrichir notre compréhension de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale¹⁶. Ces données soulignent le rôle des mutations neutres (non triées par la sélection naturelle), des événements catastrophiques et des contraintes évolutives.

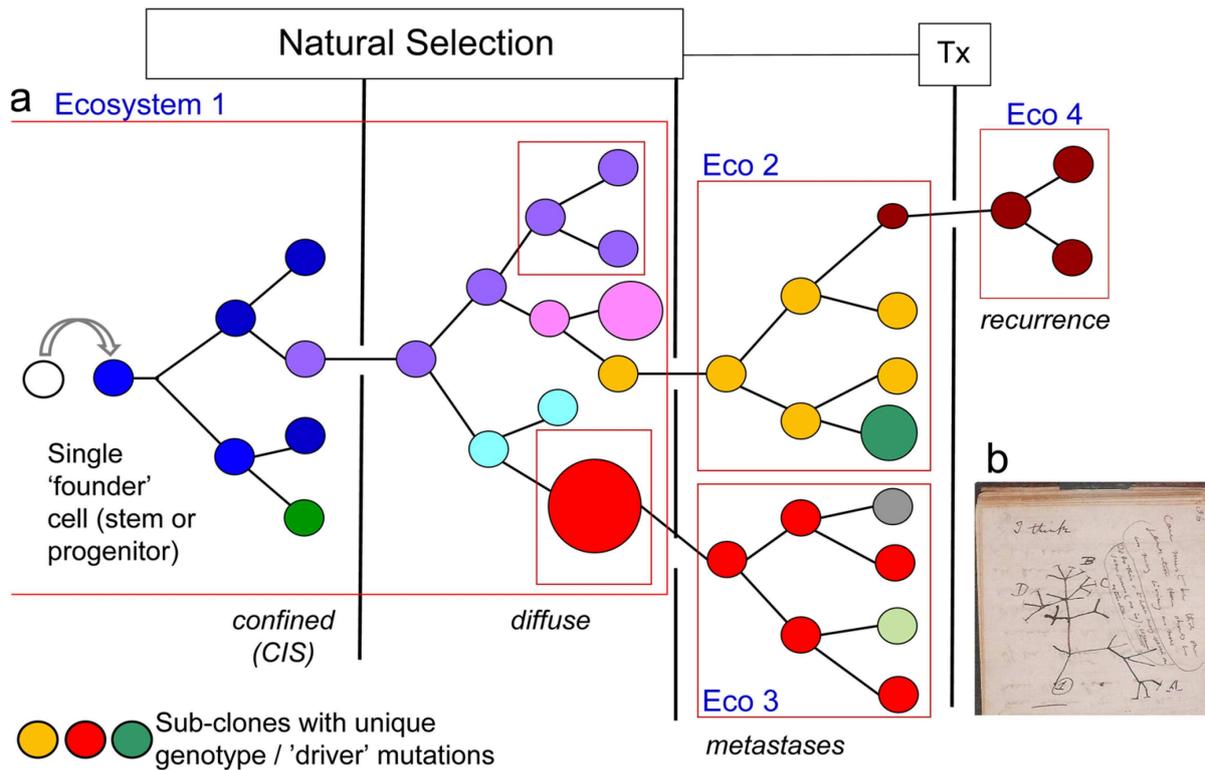


Figure 1.1-2 Modèle d'évolution darwinienne du cancer.

(a) Au cours de l'évolution, des clones cellulaires dotés d'un avantage sélectif s'expandent dans la tumeur primitive (écosystème 1), dans la métastases (écosystèmes 2 et 4) et sous la pression thérapeutique (écosystème 4). La sélection naturelle conduit à l'extinction des clones moins avantageés créant une hétérogénéité intra-tumorale. (b) Parallèle avec l'évolution ramifiée rapportée par Darwin en 1837. CIS, carcinome *in situ* ; THX, thérapeutique. D'après Greaves et Maley¹⁴.

1.1.4 Évolution ramifiée ou linéaire, contraintes et interactions clonales

Les mutations qui s'accumulent diversement dans les cellules malignes sont à l'origine de sous-clones. Certains d'entre eux peuvent avoir un avantage compétitif sur les autres, d'autres pas. Ceux qui ont un avantage compétitif peuvent le perdre à l'occasion d'un nouvel événement. Les effets de l'accumulation de mutations dans les cellules ne sont donc pas linéaires et peuvent conduire au développement de ramifications (ou *embranchements*) entre les sous-clones à l'origine d'une hétérogénéité génétique intra-tumorale (Figure 1.1-3A)¹⁷. Ce modèle évolutif a été rapporté dans les travaux fondateurs de l'équipe de Charles Swanton dans le cancer du rein à cellules claires (cRCC)⁷.

On oppose classiquement le modèle ramifié au modèle linéaire où des sous-clones émergents s'expandent rapidement et remplacent successivement des clones préalablement fixés (*clonal sweep*) créant une architecture clonale uniforme (Figure 1.1-3B). Cette évolution est surtout rapportée dans les hémopathies malignes¹⁸⁻²⁰ et dans les cRCC liés à des mutations germinales de *VHL*²¹.

La réalité biologique n'est pas toujours aussi nuancée. Au cours de l'évolution linéaire, une tumeur continue d'accumuler des mutations après l'étape de fixation clonale. Des branchements peuvent donc apparaître en dépit de l'uniformité apparente²².

Cette hétérogénéité intra-tumorale est également façonnée par des contraintes qui prennent la forme d'une évolution convergente ou parallèle. La convergence est définie par la présence de mutations affectant des gènes ou des voies oncogéniques similaires dans des tumeurs synchrones non héritées d'un ancêtre commun (Figure 1.1-3C). Dans une étude portant sur des cRCC héréditaires, les mutations dans des tumeurs synchrones concouraient à l'activation de la voie PI3K-Akt-mTOR suggérant une évolution convergente²¹. L'évolution parallèle est définie par la présence de mutations affectant des gènes ou des voies oncogéniques similaires dans plusieurs sous-clones (Figure 1.1-3D)^{23,24}.

L'interaction entre les sous-clones ajoute enfin un niveau de complexité supplémentaire à notre compréhension de l'hétérogénéité intra-tumorale. Cette interaction peut consister en une coopération pour laquelle des clones minoritaires favorisent l'expansion de clones plus agressifs (Figure 1.1-3E)^{25,26}. Cette coopération clonale a été rapportée au cours de la progression métastatique où différents sous-clones essaient ensemble au même endroit (Figure 1.1-3H)²⁷. Cette interaction peut inversement consister en une interférence où un clone dominant gêne l'expansion d'un clone minoritaire (Figure 1.1-3E). Dans ce dernier cas, la contrainte sur le clone minoritaire sera levée à l'occasion d'un traitement dirigé contre le clone dominant, d'une modification du micro-environnement tumoral, ou d'une dissémination métastatique^{28,29}.

1.1.5 Évolution neutre

L'évolution neutre est définie par l'absence de sélection (Figure 1.1-3I). Les données de NGS dans le cancer colorectal ont jeté les bases de ce concept de neutralité³⁰. L'analyse comparée de biopsies réalisées en deux endroits éloignés géographiquement a permis d'identifier des sous-clones similaires suggérant leur apparition précoce dans l'histoire naturelle du cancer. Les cellules ont pu migrer sur de courtes distances au sein de la masse primordiale. Leur éclatement

d'un bout à l'autre de la tumeur a été secondairement amplifié par la croissance tumorale (modèle en *Big Bang*). La prévalence d'un clone est alors prédite par son *timing* plutôt que par un avantage génotypique. Ce modèle évolutif a pu être rapporté dans les cancers du col de l'utérus ainsi que dans des cancers urothéliaux et pulmonaires³¹.

La neutralité n'est pas constante au cours de l'évolution. La sélection peut venir la contrebalancer au moment de l'émergence du cancer (sélection de la cellule primordiale) ou sous la pression de sélection thérapeutique²².

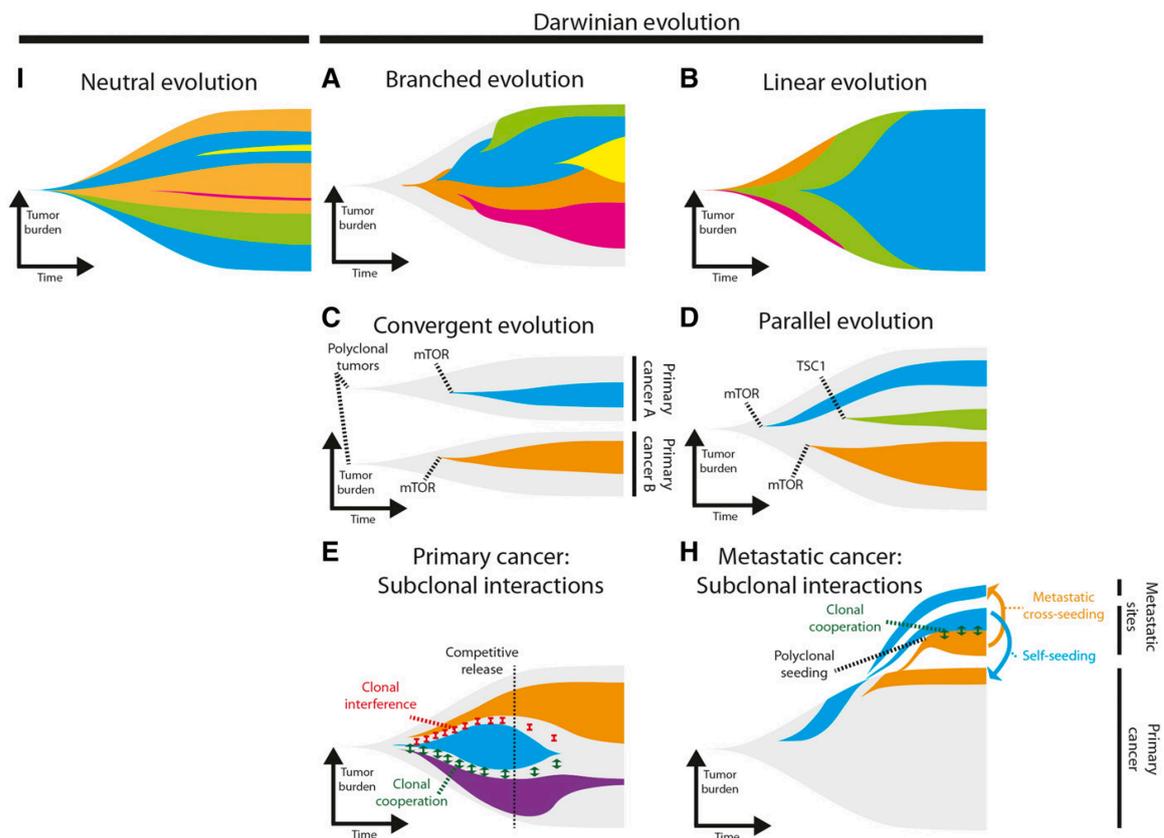


Figure 1.1-3 Complexité des modèles évolutifs.

Figure adaptée de Venkatesan et Swanton¹⁶.

1.1.6 Ponctualisme et macroévolution

Dans la conception darwinienne du cancer, l'accumulation de mutations est graduelle et les changements qui opèrent dans les cellules sont lents et réguliers (gradualisme). Le ponctualisme désigne au contraire un changement radical de phénotype conférant un avantage sélectif possiblement relié à un évènement moléculaire catastrophique^{32,33}. Ces évènements peuvent

consister en des phénomènes de doublement du génome³⁴, des tempêtes mutationnelles au voisinage des réarrangements génomiques (kataegis)³⁵, des cassures chromosomiques brutales suivies de réarrangements aléatoires à l'échelle d'un chromosome (chromothripsie)³⁶ et des réarrangements en chaîne de segments chromosomiques impliquant plusieurs chromosomes (chromoplexie)³⁷. Sous ces conditions, le développement du cancer serait un compromis entre de longues périodes d'équilibre mutationnel et des bonds évolutifs succédant à un événement moléculaire *driver* comme cela a été rapporté dans les cancers du sein triple négatifs³⁸. Ces phénomènes macro-évolutifs représentent un tournant pronostic dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC)³⁹, le gliome⁴⁰ et le cRCC⁴¹.

En raison de son mode de reproduction clonale, une tumeur se développe à la manière d'un organisme asexué. Quand une mutation délétère apparaît, la tumeur a peu de chances de s'en débarrasser. Or, les phénomènes macro-évolutifs impliquent l'occurrence d'évènements catastrophiques potentiellement délétères incluant des pertes d'hétérozygotie (LOH) sur de larges fragments du génome. Un phénomène adaptatif récurrent réside dans le doublement du génome^{34,42}. La mise à disposition d'allèles sauvages additionnels permet à la cellule maligne de mieux tolérer les LOH impliquant des gènes essentiels à sa survie et à sa prolifération⁴³.

1.1.7 Limites des modèles évolutifs et illusion de la clonalité

Un cancer est souvent réduit à un modèle évolutif. En réalité, son histoire naturelle est déterminée par une succession de processus évolutifs (Figure 1.1-4)²². Des biais peuvent également en limiter la perception en raison de l'existence d'une l'hétérogénéité spatiale et temporelle. Une seule biopsie capture l'architecture clonale en un seul endroit et en un seul instant exposant au risque d'illusion de clonalité (Figure 1.1-5)⁸. Si la tumeur est prélevée au décours de la fixation d'un clone dominant l'évolution apparaît linéaire alors qu'elle est ramifiée l'instant d'avant.

Une approche innovante de l'évolution consisterait à récapituler les contributions relatives de ses déterminants (incluant les mutations, la sélection naturelle et la dérive génétique) pour pouvoir générer un index évolutif du cancer⁴⁴.

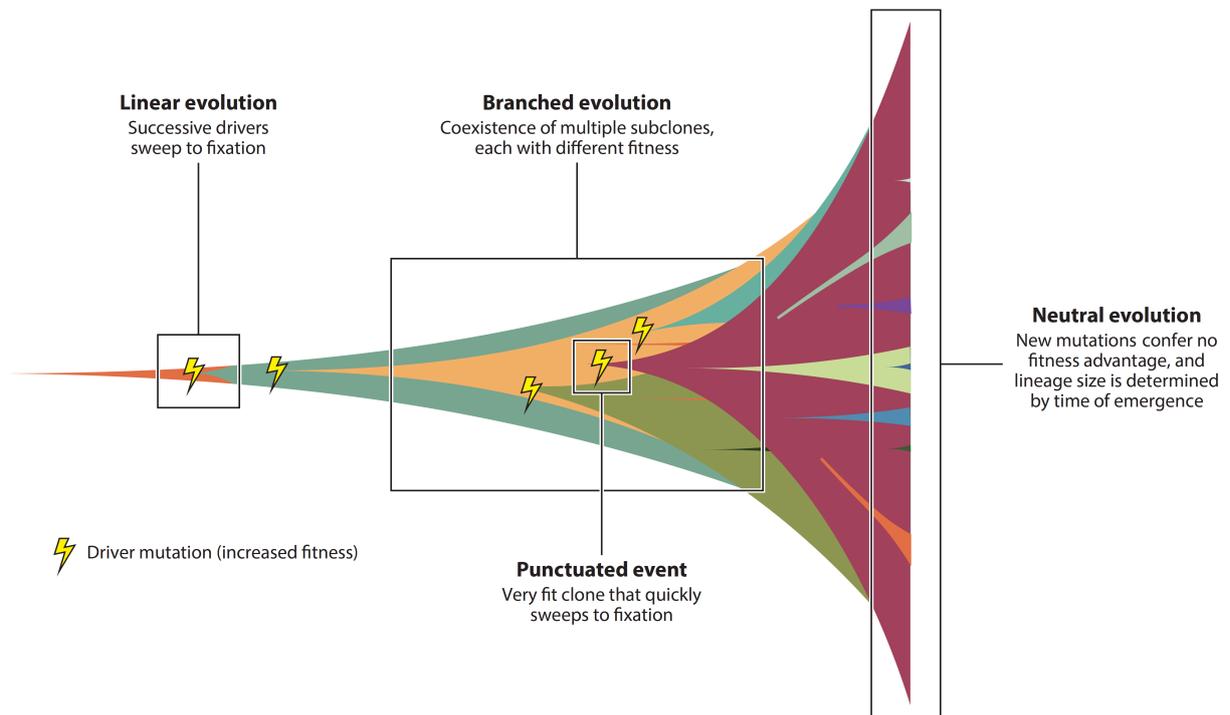


Figure 1.1-4 Un cancer est déterminé par une succession de processus évolutifs. Le diagramme de Müller récapitule des évolutions linéaires, ramifiées, ponctuées et neutres. D'après Williams et al.²²

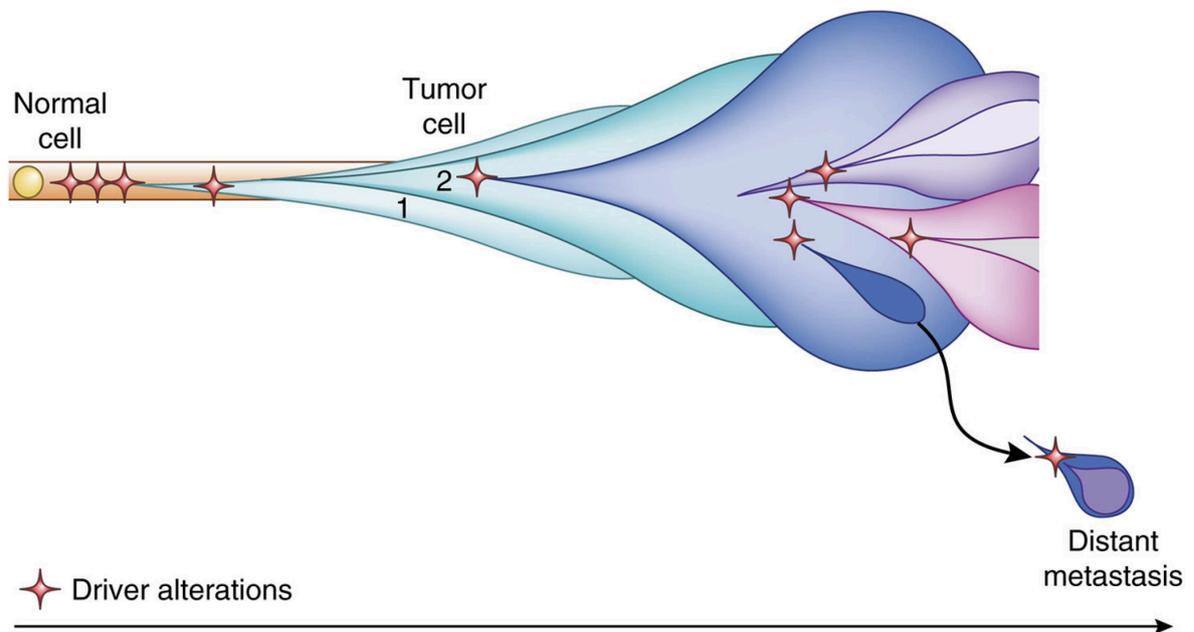


Figure 1.1-5 Illusion de la clonalité.

Un évènement moléculaire *driver* initie l'expansion d'un clone fondateur (1) qui se ramifie à mesure que des mutations s'accumulent diversement dans les cellules (2). Une biopsie au repère (1) permet de capturer le clone fondateur. Une biopsie au repère (2) renvoie une illusion de clonalité en raison de l'hétérogénéité intra-tumorale spatiale et temporelle. D'après Alizadeh *et al.*⁸

1.1.8 Mutations

1.1.8.1 Instabilité génétique

Les mutations sont les déterminants aléatoires de l'évolution et de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale. Elles engendrent la diversité génétique sans laquelle la sélection ne pourrait avoir lieu.

La probabilité d'apparition d'une mutation ponctuelle dans une population cellulaire va dépendre du taux de mutation à chaque génération, de la taille de la population et de la durée d'évolution. Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une instabilité génétique à l'origine d'un taux de mutation particulièrement élevé (10^{-4} variants/paires de bases/génération) en comparaison d'une cellule normale (10^{-8} variants/paires de base/génération)^{45,46}. À cette accumulation de mutations ponctuelles s'ajoutent des évènements génétiques catastrophiques qui affectent de larges segments du génome (chromothripsie, chromoplexie et LOH).

Cette instabilité génétique est la conséquence d'anomalies dans les voies de réparation et de réplication de l'ADN⁴⁷⁻⁴⁹. Cette propriété acquise très tôt au cours du développement tumoral est un *hallmark* du cancer^{50,51}. L'instabilité génétique équipe la cellule tumorale du potentiel pour tolérer d'autres altérations génétiques (incluant des évènements catastrophiques) et pour évoluer et s'adapter à un écosystème particulier⁵⁰. En augmentant les chances de diversification sous-clonale, l'instabilité génétique est un puissant contributeur de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale⁵².

1.1.8.2 Hallmarks d'instabilité génétique

L'instabilité génétique est à l'origine d'un taux élevé de mutations ponctuelles⁵³⁻⁵⁵, de réarrangements chromosomiques⁵⁶ et de variations de nombre de copies (CNV)^{56,57} propageant une diversité génétique importante parmi les sous-clones.

Il existe plusieurs types de variants répertoriés selon la taille du génome qu'ils affectent. Les variants ponctuels sont des substitutions (SNV) ou des insertions/délétions (InDel) n'affectant qu'un seul nucléotide ou un petit nombre de nucléotides. Les variants ponctuels peuvent modifier la région codante d'une protéine conduisant à une perte de fonction (cas des mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs) ou un gain de fonction (cas des mutations dans des oncogènes).

Les variants structuraux sont des variations qui affectent une grande région génique ou chromosomique impliquant des segments d'ADN ayant généralement une taille plus grande que 1 kilobase⁵⁸⁻⁶⁰. Il en existe plusieurs types :

- Les CNV sont des séquences supérieures à 1 kilobase surnuméraires ou déficitaires comparativement au génome de référence en raison d'une duplication ou d'une délétion⁶¹ ;
- Les inversions sont des réarrangements chromosomiques où un segment d'ADN est inversé par rapport au reste du chromosome ;
- Les translocations sont des réarrangements chromosomiques affectant un ou plusieurs chromosome(s) en lien avec le déplacement d'un fragment de chromosome plus ou moins long ;
- Les insertions correspondent à l'introduction d'une séquence endogène mobile ou exogène virale.

Les CNV peuvent affecter une grande proportion du génome⁶². Ces événements *copy number* sont la conséquence d'une instabilité chromosomique et impliquent un gain ou une perte d'un chromosome entier ou d'un segment de chromosome (aneuploïdie)⁴⁹. L'instabilité chromosomique est la conséquence d'une accumulation d'erreurs au cours de la mitose ou durant la réplication ou la réparation de l'ADN^{63,64}.

Au-delà de l'instabilité chromosomique, une aneuploïdie peut être la conséquence d'une anomalie isolée durant la mitose ou la conséquence d'un événement génétique catastrophique⁶⁵. Les implications en termes d'hétérogénéité génétique sont considérables. L'instabilité chromosomique propage une diversité de génomes aneuploïdes parmi les sous-clones alors que l'aneuploïdie est circonscrite à un seul sous-clone en cas d'anomalie isolée^{66,67}.

1.1.9 Sélection

L'avantage sélectif conféré par un génotype à une cellule est défini par le nombre de progénies viables et fertiles que produit en moyenne chaque cellule de ce génotype à la génération suivante.

Une sélection positive opère sur des cellules dotées d'un avantage compétitif en termes de survie et de prolifération et une capacité à échapper aux contraintes imposées par le micro-environnement tissulaire (définissant des *hallmarks* du cancer). La sélection négative conduit inversement à l'élimination des cellules portant des mutations délétères ou neutres. Par exemple, certaines mutations ponctuelles produisent des néoantigènes exprimés à la surface des cellules reconnus par l'immunité anti-tumorale. La détection de ces mutations immunogènes permet d'ailleurs de prédire l'efficacité de l'immunothérapie⁶⁸.

L'effet de la sélection sur l'hétérogénéité intra-tumorale est inversement proportionnelle à la taille de la tumeur^{30,69}. Un sous-clone émergent sera moins représenté dans une tumeur à un stade avancé que dans une tumeur à un stade précoce.

1.1.9.1 Sélection des clones métastatiques

La sélection qui opère au cours de l'évolution métastatique façonne l'hétérogénéité entre la tumeur primitive et ses métastases (Figure 1.1-6). Le modèle linéaire de sélection clonale prévoit que la compétence métastatique est acquise durant l'accumulation successive d'altérations génétiques indépendantes par un sous-clone minoritaire d'apparition tardive⁷⁰. Les cellules métastatiques emportent la majorité des mutations identifiées dans la tumeur primitive et l'hétérogénéité entre la tumeur primitive et ses métastases est faible. Ce modèle ne permet pas d'expliquer l'évolution métastatique dans certains cancers où la dissémination des cellules tumorales semble opérer beaucoup plus tôt dans l'histoire naturelle^{71,72}.

Le modèle de dissémination précoce prévoit que la capacité à disséminer n'est pas acquise *de novo* mais résulterait de la réactivation d'un programme génétique utilisé lors de l'embryogenèse (la transition épithélio-mésenchymateuse)⁷³⁻⁷⁵. L'analyse comparée des génomes de tumeurs primitives, de métastases et des cellules tumorales circulantes conforte le modèle de dissémination précoce suivie d'une accumulation parallèle de nouvelles mutations dans la tumeur primitive à l'origine d'une hétérogénéité plus importante entre la tumeur primitive et ses métastases⁷⁶.

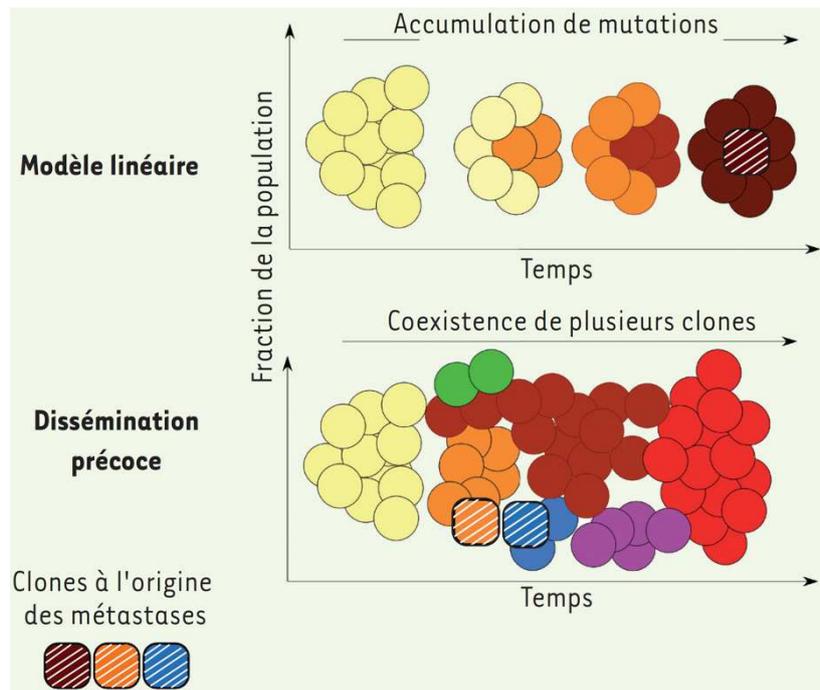


Figure 1.1-6 Modèle linéaire et dissémination précoce des métastases.

D'après Hubert et Abastado⁷⁷.

1.1.9.2 Sélection des clones sous traitement

La pression thérapeutique façonne l'hétérogénéité génétique intra-tumorale en réduisant partiellement^{78,79} voire complètement^{80,81} la part de diversité génétique entre les sous-clones. Les sous-clones sensibles sont éliminés réduisant la masse tumorale avec un bénéfice apparent important alors qu'en même temps les sous-clones résistants sont sélectionnés. Mais cette évolution sous traitement n'est pas une règle. La pression thérapeutique peut au contraire accroître l'hétérogénéité apparente d'une tumeur en perturbant les interactions entre les sous-clones comme cela a été montré dans la leucémie lymphoïde chronique²⁹.

1.1.10 Déterminants non génétiques de l'hétérogénéité intra-tumorale

1.1.10.1 Micro-environnement tumoral

Les mutations qui s'accumulent diversement dans les cellules sont insuffisantes pour permettre l'émergence d'une tumeur^{82,83}. Une participation de l'environnement tissulaire a été suggéré par l'observation que l'incidence des cancers augmente uniformément au-delà de 50 ans

indépendamment de la cellule d'origine ou de l'exposition à des agents mutagènes^{84,85}. L'environnement tissulaire peut longtemps contenir l'expansion d'un clone malin et son vieillissement va avoir pour effet de relâcher le contrôle immunitaire des cellules mutées⁸⁶.

L'hétérogénéité est perceptible au niveau du micro-environnement tumoral à travers une variété de réponses adaptatives aux agents mutagènes et de charges mutationnelles^{87,88}. Cette hétérogénéité est également la conséquence de la capacité du micro-environnement à sélectionner des cellules malignes sur des critères physiques de densité cellulaire et d'accessibilité aux ressources nécessaires au métabolisme. Elle est façonnée dans les métastases par la sélection de cellules souches cancéreuses dotées de propriétés d'auto-renouvellement et capables de reproduire la composition clonale d'une tumeur^{89,90}.

L'effet oncogénique, neutre ou délétère d'une mutation varie en fonction du tissu dans lequel elle opère²². Dans les syndromes de prédisposition génétique au cancer, des mutations présentes dans toutes les cellules de l'organisme et hautement pénétrantes prédisposent invariablement à des tumeurs circonscrites au système nerveux (neurofibromatose)⁹¹, aux tissus mous et osseux (syndrome de Li-Fraumeni)⁹² et aux glandes mammaires (mutation germinale de *BRCA1/2*)⁹³.

1.1.10.2 Plasticité cellulaire

La plasticité cellulaire est définie par un changement adaptatif des propriétés biologiques d'une cellule sans modification de son génotype en réponse à un stress du micro-environnement ou une pression thérapeutique⁹⁴⁻⁹⁶. Ce processus met en œuvre des changements à la fois réversibles et dynamiques au niveau épigénétique et transcriptionnel différents des mutations⁹⁷. Cette plasticité peut conduire à l'émergence (rapide et transitoire) de phénotypes cellulaires distincts dans une population de cellules portant un génome identique contribuant à l'hétérogénéité intra-tumorale^{98,99}. La réactivation d'un programme génétique utilisé lors de l'embryogenèse (appelé transition épithélio-mésenchymateuse) en est un exemple classique¹⁰⁰. La transition mésenchymateuse réprime l'adhérence intercellulaire, provoque la sécrétion de métalloprotéases matricielles et induit un phénotype motile dans un délai court compatible avec la dissémination précoce des métastases^{73,74,101}.

Cette plasticité cellulaire a été montrée *in vivo* dans des modèles PDX (*Patient-Derived Xenografts*) de mélanome par le développement de mécanismes de résistance indépendamment des mutations à l'encontre des inhibiteurs de la voie MAP kinase¹⁰².

1.2 Méthodes de caractérisation de l'hétérogénéité intra-tumorale

1.2.1 Principe de la déconvolution clonale

Le génome tumoral (ou plus exactement les différences entre les génomes des cellules malignes) est une fenêtre sur les événements moléculaires ancestraux et les liens de parenté phylogénétique entre les cellules. Les mutations sont des *étiquettes* qui permettent de suivre l'évolution clonale d'une tumeur et d'en appréhender l'hétérogénéité génétique intra-tumorale (Figure 1.2-1A). Ces mutations peuvent être caractérisées par des approches de NGS sur un prélèvement tissulaire entier (*bulk sequencing*) ou sur des cellules individuelles²².

En séquençant le tissu, la détection de mutations présentes dans le pool d'ADN est possible jusqu'à un certain seuil fixé par la profondeur de séquençage mais l'information relative à la co-occurrence des mutations (*phasing*) est perdue (Figure 1.2-1B). Le séquençage des cellules individuelles permet de reconstituer les lignées cellulaires avec une résolution parfaite des événements moléculaires accumulés au cours de l'évolution (Figure 1.2-1C).

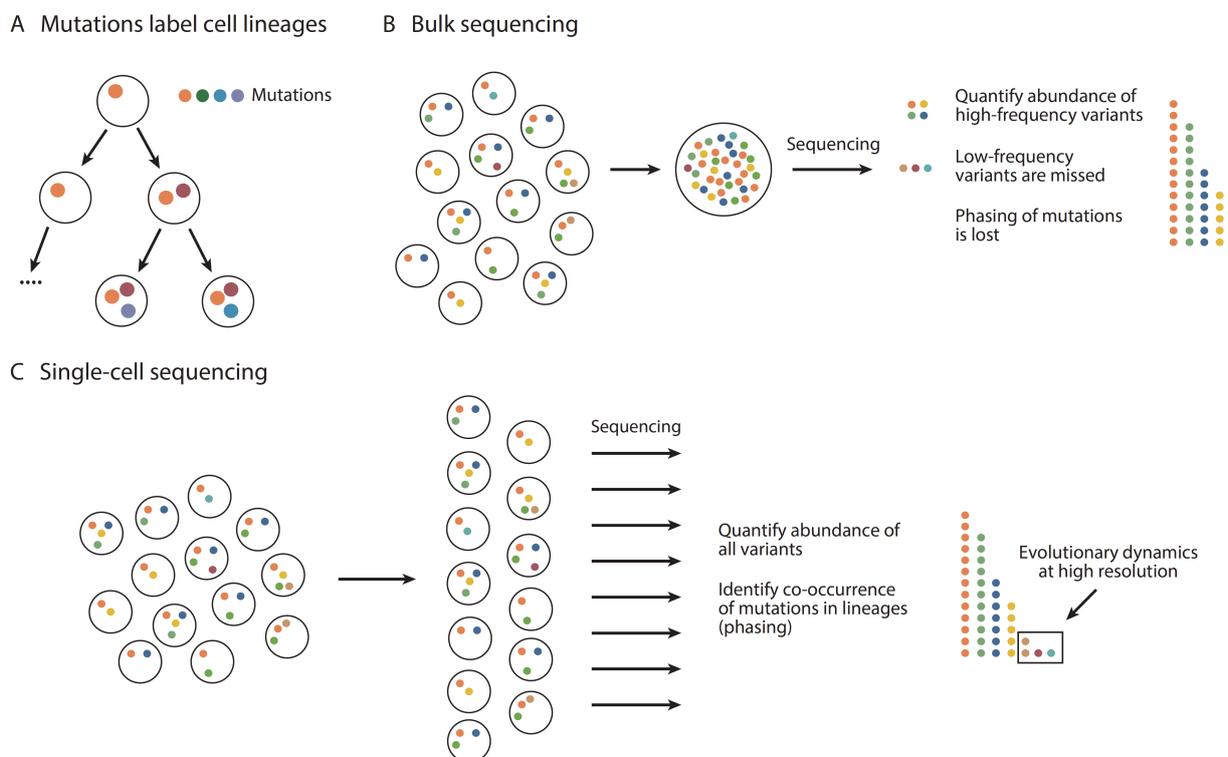


Figure 1.2-1 Séquençage des tissus ou des cellules individuelles.

(A) Les mutations sont des *étiquettes* qui s'accumulent dans les cellules au cours des divisions. (B) Les mutations rares et les co-occurrences (*phasing*) sont manquées par les approches de *bulk sequencing*. (C) En séquençant individuellement les cellules, la résolution des évènements moléculaires est parfaite. D'après Williams *et al.*²²

Des clusters mutationnels représentant les sous-clones qui composent une tumeur peuvent être individualisés par des méthodes de déconvolution clonale en utilisant la fréquence allélique des mutations (VAF). Les clusters sont ensuite ordonnés le long d'un arbre phylogénétique retraçant les évènements moléculaires ancestraux présents dans toutes les cellules tumorales (tronc de l'arbre) et les liens de parenté entre les sous-clones (branches de l'arbre). Sa construction est basée sur des principes phylogénétiques. Sa justesse dépend étroitement de la nature du séquençage des tissus (unique ou multirégional) ou des cellules individuelles. La lecture d'un arbre phylogénétique permet finalement d'appréhender l'hétérogénéité génétique intra-tumorale au niveau spatial et temporel comme cela a été montré historiquement dans les cRCC⁷.

Une biopsie solide est composée d'un mélange de cellules normales et de cellules malignes (Figure 1.2-2A). Chaque mutation est présente dans une fraction de cellules tumorales (CCF) qui peut être estimée à partir des VAF, du profil de CNV et de la cellularité tumorale. Les mutations partageant des CCF similaires sont finalement poolées en clusters. Cette étape est rendue possible par l'utilisation d'algorithmes de *clustering*. La Figure 1.2-2B illustre l'espace de représentation des CCF où une mutation clonale présente dans 100% des cellules tumorales apparaît dans un cluster au repère 1.0. Les mutations sous-clonales présentes dans 33% et 17% des cellules tumorales clustérisent différenciellement aux repères 0.33 et 0.17.

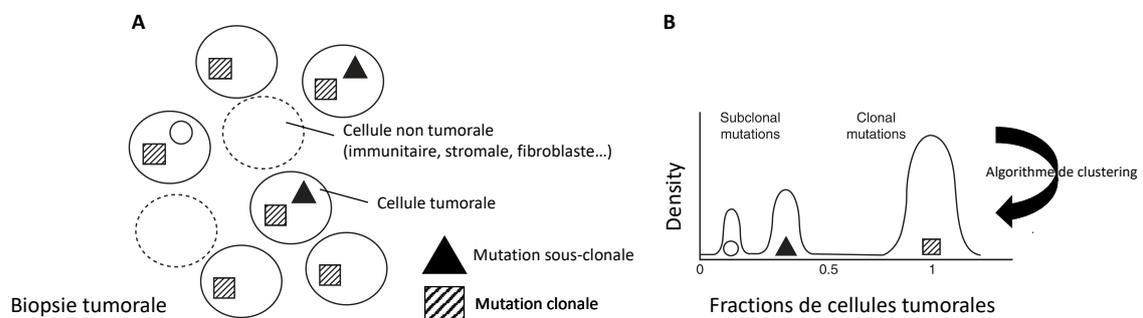


Figure 1.2-2 Déconvolution clonale des données de *bulk sequencing*.

(A) Une biopsie tumorale est composée de cellules normales et de cellules tumorales mutées.
 (B) Les CCF des mutations sont estimées en utilisant les données de fréquences alléliques, de profils de CNV et de cellularité tumorale. Des clusters mutationnels sont générés en poolant les mutations qui partagent des CCF similaires. Figure adaptée de S.C. Dentro *et al.*¹⁰³

1.2.2 Estimation des fractions mutationnelles

Nous détaillons la méthode utilisée par la plupart des algorithmes bioinformatiques pour la déconvolution clonale en utilisant les données de *bulk sequencing*^{104–106}. Cette étape de déconvolution clonale est un préalable indispensable à l'inférence des liens de parenté phylogénétique entre les sous-clones et à la caractérisation de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale.

La déconvolution clonale utilise les CCF observées bien que des événements moléculaires sous-clonaux puissent biaiser leurs estimations³⁹. Considérons le cas d'une mutation clonale présente dans toutes les cellules de la tumeur. Un événement sous-clonal de type CNV a pour conséquence la perte de la mutation dans quelques cellules. La CCF observée pour cette mutation est inférieure à 1 alors qu'en réalité la mutation est clonale (la CCF *phylogénétique* est égale à 1).

L'estimation des CCF commence avec l'analyse des données élémentaires de séquençage (les *reads*) pour la recherche de variants. Les *reads* sont successivement filtrés, alignés contre le génome de référence puis parcourus position par position pour identifier des différences par rapport à la séquence de référence dans l'étape d'appel de variants. La proportion de *reads* contenant un variant donné est la VAF. Étant donné une mutation ponctuelle i où $r_{mut,i}$ et $r_{ref,i}$ désignent respectivement les *reads* mutés et de référence, VAF_i est donnée par :

$$VAF_i = \frac{r_{mut,i}}{r_{mut,i} + r_{ref,i}} \quad (1)$$

La VAF varie en fonction des CNV comme illustré dans la Figure 1.2-3. Quatre VAF sont mesurées dans un échantillon composé de 80% de cellules tumorales. Un variant ponctuel est clonal en (1) et tombe dans une région du génome diploïde. Le variant est sous-clonal en (2) et tombe dans une région diploïde. Les variants (1) et (2) sont directement comparables pour l'inférence clonale car la cellularité tumorale et les nombres de copies sont similaires. Le variant est clonal en (3) et apparaît avant une délétion sous-clonale de son allèle sauvage. Sa VAF s'en trouve mécaniquement augmentée. Le variant est clonal en (4) et apparaît avant un gain sous-

clonal de l'allèle mutée. Bien que les mutations (1), (3) et (4) soient clonales, les VAFs sont toutes différentes.

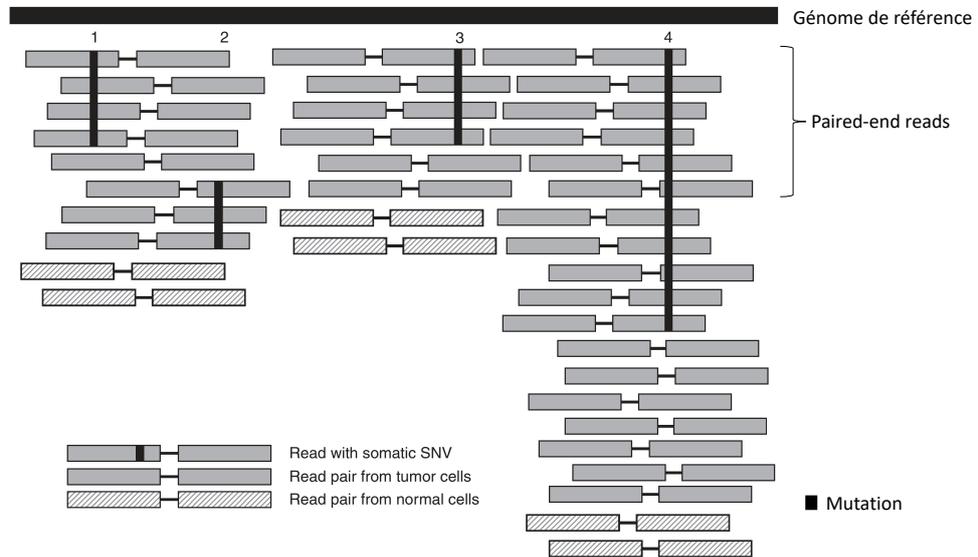


Figure 1.2-3 Variation des VAF en fonction des CNV et de la cellularité tumorale.

Figure adaptée de S.C Dentre *et al.*¹⁰³

Nous voyons avec cet exemple que l'inférence clonale est liée au nombre de copies des mutations dans le génome tumoral, également appelé *multiplicité*. Nous considérons par la suite un variant ponctuel i . En ajustant la fréquence allélique à la cellularité tumorale et au profil de CNV, nous pouvons calculer approximativement un nombre de copies u_i (les outils d'appels de CNV n'ayant pas la résolution du nucléotide) lié à la multiplicité m_i par l'équation :

$$u_i = CCF_i m_i \quad (2)$$

Considérons les propriétés de u_i . Sous l'hypothèse de clonalité, $CCF_i = 1$ et $u_i \geq 1$ puisque la multiplicité est un entier naturel non nul. Sous l'hypothèse de sous-clonalité, $CCF_i < 1$ par définition, et $u_i < 1$. En faisant abstraction des CNV sous-clonaux, nous pouvons dire que la mutation est portée par une seule copie, tel que $m_i = 1$. Des assertions précédentes, il découle que :

$$m_i = \begin{cases} u_i, & u_i \geq 1 \\ 1, & u_i < 1 \end{cases} \quad (3)$$

Autrement dit, une mutation est clonale si le nombre de copies observé dans l'échantillon est supérieur à 1. La mutation est sous-clonale dans le cas contraire et sa multiplicité vaut 1. Nous pouvons alors calculer u_i à partir de la fréquence allélique VAF_i ajustée à la cellularité tumorale ρ et aux profils de CNV au locus i dans les cellules tumorales $n_{t,i}$ et dans les cellules normales $n_{n,i}$:

$$u_i = VAF_i \frac{1}{\rho} [\rho n_{t,i} + (1 - \rho) n_{n,i}] \quad (4)$$

Nous pouvons enfin estimer la prévalence de la mutation (CP) dans l'échantillon tumoral :

$$CP_i = CCF_i \rho \quad (5)$$

1.2.3 Utilisation des variants ponctuels pour la déconvolution clonale

Les CCF sont des estimations basées sur des VAF dont la précision varie avec la profondeur de séquençage. Les clusters mutationnels établis sur ces estimations sont également variables et dispersés sur l'espace de représentation des CCF (Figure 1.2-2B). Il est donc nécessaire de prendre en compte cette part d'incertitude dans l'inférence de la composition clonale d'une tumeur pour pouvoir appréhender son hétérogénéité génétique.

Le nombre de *reads* mutés r_i observé dans un séquençage peut être vu comme une réalisation d'une loi binomiale de paramètres $r_{tot,i}$ (le nombre total de *reads* couvrant le locus i) et p_i (la probabilité d'observer un *read* muté) tel que :

$$r_i \sim Bin(r_{tot,i}, p_i) \quad (6)$$

Dans l'équation (6), *Bin* est la loi binomiale et la notation $X \sim D$ signifie que la variable aléatoire X se distribue selon la loi D . Le paramètre p_i n'est pas connu *a priori* et dépend de la fréquence allélique attendue ζ_i sous l'hypothèse de clonalité et de la *vraie* proportion de cellules tumorales π_i portant la mutation :

$$p_i = \zeta_i \pi_i \quad (7)$$

Le paramètre ζ_i peut être estimé à partir de la cellularité tumorale et du profil de CNV. Une estimation de π permet de distribuer les clusters mutationnels sur l'espace de représentation des CCF. La procédure est basée sur le processus de Dirichlet (DP) qui permet de s'affranchir de la connaissance *a priori* d'un nombre de clusters^{29,35,104,106,107}.

Le DP est un processus aléatoire dont les réalisations discrètes sont des probabilités. Ce processus produit une loi *a priori* permettant de décrire une infinité de proportions observables d'un mélange.

Étant donné un set mesurable S , une distribution de base H et un paramètre d'échelle positif α , $DP(\alpha, H)$ est un processus de Dirichlet dont les réalisations sont des probabilités sur S . Pour toute partition finie et mesurable de S notée $\{B_i\}_{i=1}^n$:

$$\text{si } X \sim DP(\alpha, H), \quad (8)$$

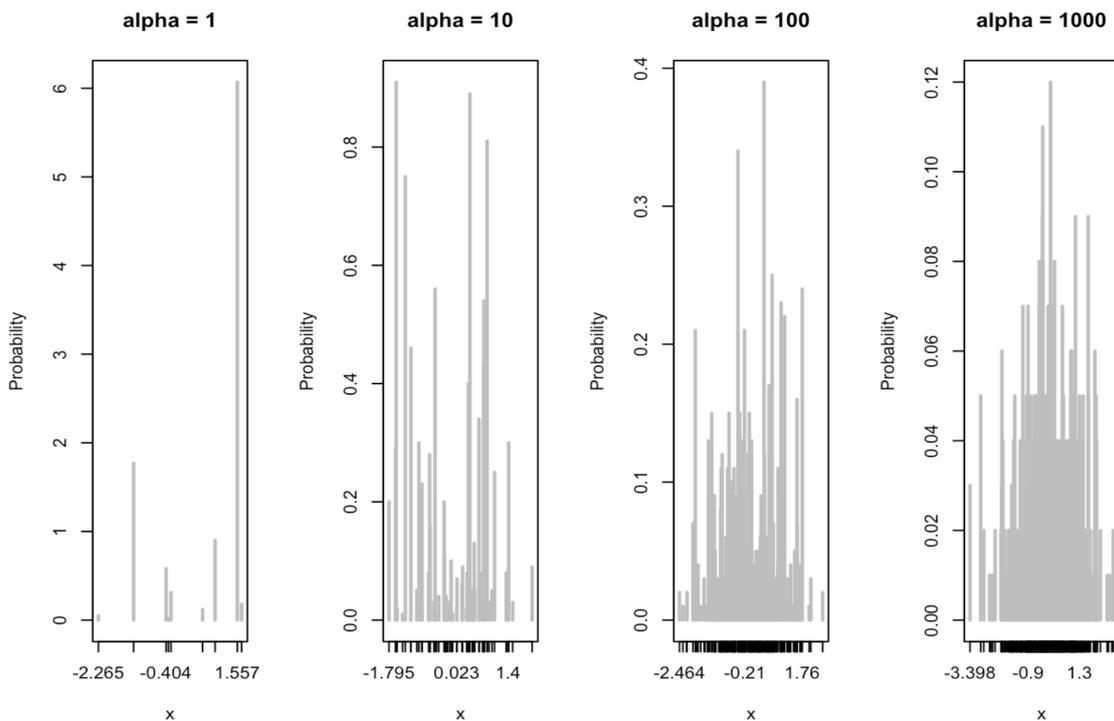
$$\text{alors } (X(B_1), \dots, X(B_n)) \sim Dir(\alpha H(B_1), \dots, \alpha H(B_n)) \quad (9)$$

Dans l'équation (7), *Dir* est la loi de Dirichlet. Pour l'illustrer, nous avons simulé des réalisations sur une partition $\{B_i\}_{i=1}^n$ en spécifiant $n = 1000$ et $B_i \sim N(0,10)$ pour différentes valeurs de α comprises entre 1 et 1000 (Algorithme 1.2-1). On remarquera qu'une valeur élevée de α favorise l'apparition d'un grand nombre de clusters différents et que la distribution tend vers H à mesure que α augmente.

```

# La distribution de base G_0 est la loi normale centrée réduite
G_0 <- fonction(n) rnorm(n, 0, 1)
n <- 1000
par(mfrow=c(1,4))
# Nous simulons un processus de Dirichlet selon différents paramètres d'échelle
sur une partition finie et mesurable de G_0
for (c in c(1, 10, 100,1000)){
  b <- rbeta(n, 1, c)
  p <- numeric(n)
  p[1] <- b[1]
  p[2:n] <- sapply(2:n, fonction(i) b[i] * prod(1 - b[1:(i-1)]))
  y<-round(G_0(n),3)
  theta <- sample(y, prob = p, replace = TRUE)
  plot(table(theta)/100, col="Gray", main=paste("alpha =",c),xlab="x",ylab="Probab
ility")
}

```



Algorithme 1.2-1 Plusieurs réalisations d'un processus de Dirichlet selon différents paramètres d'échelle α pour une distribution de base normale centrée réduite.

La composition clonale illustrée dans la Figure 1.2-2B est une distribution de proportions $\pi = \{\pi_1, \dots, \pi_i\}$ sur l'espace de représentation des CCF (loi *a priori* du mélange). Chaque observation à l'intérieur d'un cluster est une CCF θ_h dont la distribution de base P_0 est supposée connue. Nous pouvons produire une estimation de π à partir de P_0 et d'un paramètre d'échelle α :

$$\pi \sim DP(\alpha P_0) \quad (10)$$

Dans l'équation (9), DP est le processus de Dirichlet. Cette approche permet d'estimer un nombre approprié de clusters, de CCF correspondantes ainsi que le nombre de mutations dans chaque cluster. En répétant le processus, les proportions $\pi_{\theta h}$ assignées itérativement à une (possible) infinité de clusters convergent jusqu'à estimation de π .

Étant donné une composition clonale X , une loi *a posteriori* $P(\pi|X)$ peut être inférée à partir de la loi *a priori* et de la vraisemblance $P(X|\pi)$ en utilisant le théorème de Laplace-Bayes :

$$Pr(\pi|X) \propto Pr(X|\pi)Pr(\pi) \quad (11)$$

1.2.4 Utilisation des CNV pour la déconvolution clonale

1.2.4.1 Étude des déséquilibres alléliques

L'étude des profils de CNV est indispensable pour pouvoir estimer les CCF¹⁰³. La plupart des outils bioinformatiques effectuant l'appel des CNV se focalisent sur les déséquilibres de nombre de copies entre les allèles maternelles et paternelles¹⁰⁸⁻¹¹³. Une analyse restreinte aux loci alléliques (*allelic copy number*) présente plusieurs avantages par rapport à l'étude d'un grand nombre de loci (*total copy number*). Elle permet d'identifier des LOH à copie neutre, c'est-à-dire des pertes d'allèles sauvages associées aux gains d'allèles mutées. Elle produit également une estimation plus précise de la cellularité tumorale et de la ploïdie.

La Figure 1.2-4 illustre une LOH à copie neutre appréhendée selon deux méthodes (*total copy number* et *allelic copy number*). Les profils de CNV sont établis en segmentant le génome sur des valeurs constantes de log ratio (*total copy number*) ou de log odds ratio (*allelic copy number*). Les ratios sont calculés entre la tumeur et le tissu sain. Le profil de log ratio (Figure 1.2-4A) est plat alors que le profil de log odds ratio (Figure 1.2-4B) identifie deux segments 2-0 et 2-1 (où le premier entier désigne le nombre total de copie(s) d'une région génomique et l'entier en deuxième position désigne le plus petit nombre de copie(s) de la région génomique). Le segment 2-1 est une LOH à copie neutre sur le bras court du chromosome 6.

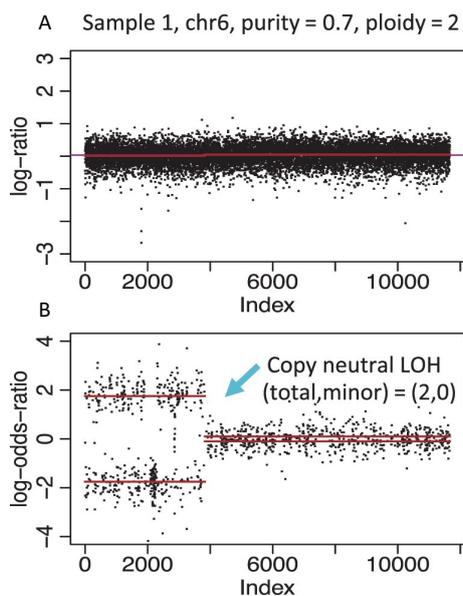


Figure 1.2-4 Profils de CNV illustrant une LOH à copie neutre.

Les profils sont rendus à partir d'analyses *total copy number* (A) et *allelic copy number* (B) de données de *whole-exome sequencing* (bras court du chromosome 6) d'un adénocarcinome bronchique. La segmentation identifie une LOH à copie neutre. D'après Shen et Seshan¹¹³.

L'étude des polymorphismes nucléotidiques (SNP) est particulièrement utile pour l'étude des CNV. Les déséquilibres alléliques sont appréhendés par les SNP hétérozygotes au niveau germinale. Étant donné un nombre de copies $n_{A,i}$ (allèle A) et $n_{B,i}$ (allèle B), la fréquence de l'allèle B (BAF) est donnée par :

$$BAF_i = \frac{n_{B,i}}{n_{A,i} + n_{B,i}} \quad (12)$$

En l'absence de déséquilibre allélique, $BAF \approx 0.5$ (Figure 1.2-5A). Toute déviation de la valeur 0.5 signale un évènement somatique de type CNV. Un gain clonal de l'allèle A aura pour conséquence une séparation des BAF où 2/3 des copies du génome sont portées par l'allèle A et 1/3 par l'allèle B (Figure 1.2-5B). L'estimation des BAF est également fonction de la cellularité tumorale et de la profondeur de séquençage. En prenant en compte la cellularité tumorale ρ et en posant :

$\{n_{A,t}, n_{B,t}\} = \text{nombre de copies dans les cellules tumorale}$

$\{n_{A,n}, n_{B,n}\} = \text{nombre de copies dans les cellules normales}$

Nous pouvons réécrire l'équation (12) de la façon suivante :

$$BAF_i = \frac{\rho n_{B,t} + (1 - \rho)n_{B,n}}{\rho(n_{A,t} + n_{B,t}) + (1 - \rho)(n_{A,n} + n_{B,n})} \quad (13)$$

En augmentant la contamination de la biopsie de 35% (cellules normales), l'effet du gain clonal est atténué (Figure 1.2-5C). En diminuant la profondeur de séquençage de 100x à 40x, la dispersion des BAF augmente ce qui a pour effet de diminuer la sensibilité de détection des événements *allelic copy number* (Figure 1.2-5D).

La BAF est fonction du caractère clonal ou sous-clonal du CNV. L'effet du gain allélique est atténué lorsqu'il est sous-clonal et cette atténuation augmente à mesure que la clonalité diminue (Figure 1.2-5E-F).

Les BAF rapportées dans la Figure 1.2-5 sont établies sur un intervalle génomique court et y sont constantes. Une segmentation peut apparaître sur un intervalle génomique plus large permettant d'appréhender le caractère clonal ou sous-clonal des CNV. Chaque segment correspond à un état *copy number* observé potentiellement différent d'une valeur théorique obtenu sous l'hypothèse de clonalité. Pour l'illustrer, considérons une fréquence allélique observée h_f correspondant à un gain sous-clonal 3-1. h_f est le résultat d'une combinaison d'états *copy number* 2-1 et 3-1 provenant d'un mélange de cellules normales diploïdes et tumorales mutées et non mutées. Nous observons que h_f dévie d'une fréquence théorique \widehat{h}_f attendue si le gain est clonal. Un segment est alors considéré sous-clonal si cette déviation est statistiquement significative.

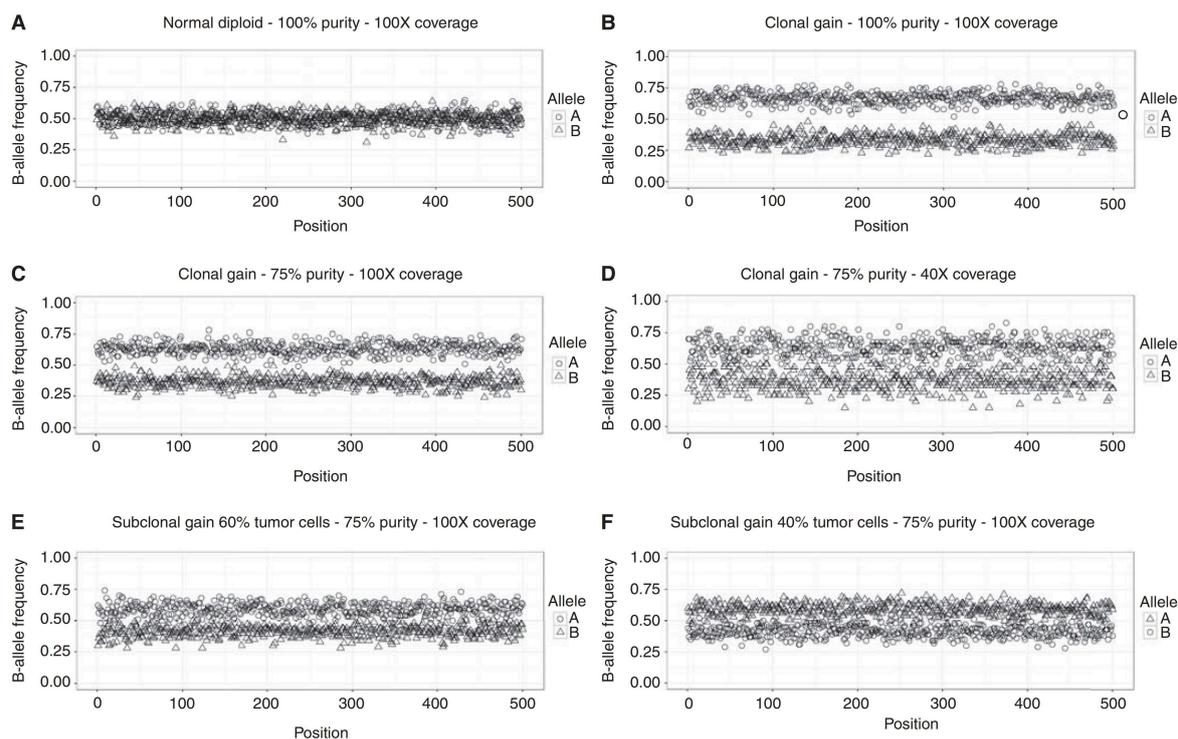


Figure 1.2-5 Variation des BAF selon différentes variables.

L'état d'équilibre allélique est montré (A). Les variables testées incluent des CNV (B), la cellularité tumorale (C), la profondeur de séquençage (D) et la sous-clonalité des CNV (E-F). D'après Dentre *et al.*¹⁰³

1.2.4.2 Déconvolution clonale avec FACETS

Les SNP hétérozygotes sont dispersés dans le génome et présentent une grande variabilité inter-individuelle pouvant conduire à une perte de l'information *copy number*. Une solution consiste à implémenter les données de séquençage des SNP homozygotes et hétérozygotes dans un même pipeline bioinformatique comme cela a été proposé par certains auteurs (FACETS, *Fraction and Allele-Specific Copy Number Estimates from Tumor Sequencing*)¹¹³.

Les ratios tumeur/tissu sain sont calculés pour tous les SNP homozygotes et hétérozygotes ($\log R$, *log ratio*) et pour les SNP hétérozygotes uniquement ($\log OR$, *log odds ratio*) permettant l'analyse combinée *total copy number* et *allelic copy number* respectivement (Figure 1.2-6A). La segmentation du génome par région de même profil *copy number* identifie des clusters génotypiques diploïdes 2-1 et aneuploïdes 1-0, 3-1 et 4-1 (Figure 1.2-6B-C). Les paramètres estimés $\log R$ et $\log OR$ d'un segment peuvent s'exprimer en fonction du nombre de copies

d'allèle maternelle m , d'allèle paternelle p et de la CCF ϕ . Les courbes récapitulant différentes combinaisons d'états *copy number* et de CCF sont représentées dans la Figure 1.2-6D. Elles divergent à mesure que la CCF augmente.

Nous nous intéressons ensuite à quelques points remarquables des courbes de $\log R$ et $\log OR$ (Figure 1.2-6D). Les états d'équilibre allélique 4-2 et 6-3 correspondent à une valeur nulle de $\log OR$ et une valeur de $\log R$ strictement positive. Les LOH à copie neutre correspondent à une valeur nulle de $\log R$ et à une valeur strictement positive de $\log^2 OR$. Les délétions homozygotes 0-0 (non représentées sur la Figure 1.2-6D) correspondent à un état d'équilibre allélique pour lequel $\log OR$ prend une valeur nulle et $\log R$ une valeur strictement négative. En exploitant les propriétés de $\log R$ et $\log OR$, il devient possible d'estimer les états *copy number* des segments et les CCF correspondantes. Les distributions de $\log R$ et $\log OR$ sont modélisées respectivement par une loi normale et une loi du khi-deux prenant en compte la part d'incertitude liée aux estimations.

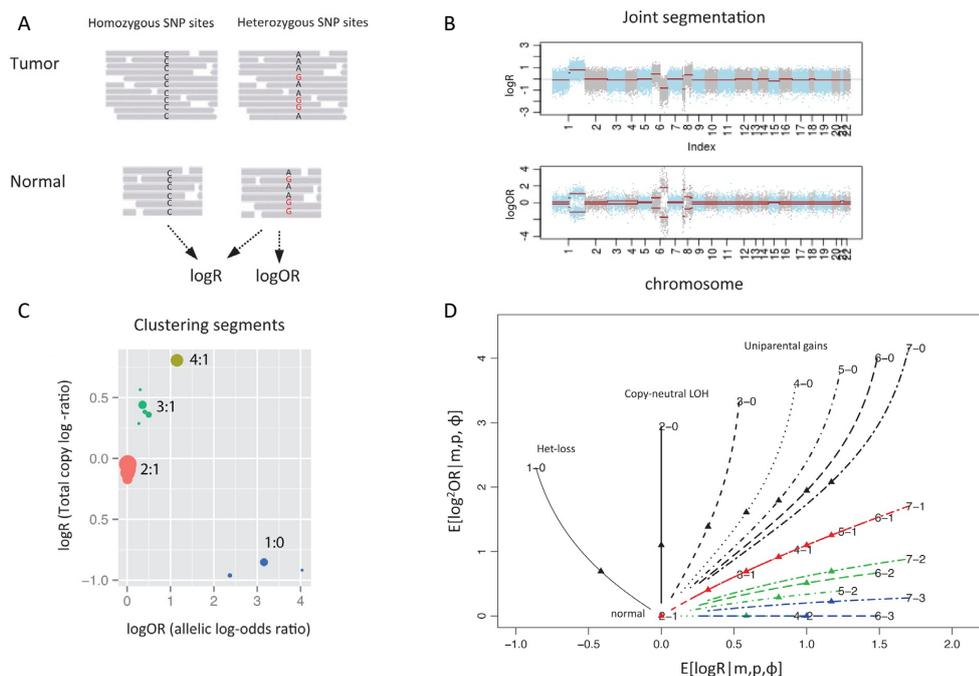


Figure 1.2-6 *Workflow* des analyses FACETS.

(A) Analyses *total copy number* ($\log R$) et *allelic copy number* ($\log OR$) en utilisant les SNP homozygotes et hétérozygotes au niveau germinale. (B) Segmentation du génome par valeurs similaires de $\log R$ et $\log OR$. (C) *Clustering* des segments du génome par profils de CNV similaires. (D) Modélisation de $\log R$ (abscisse) et $\log^2 OR$ (ordonnée) pour différentes

combinaisons d'allèle maternelle m , paternelle p et de CCF ϕ . Figure adaptée de Shen et Seshan¹¹³.

Un exemple de sortie de logiciel FACETS est présenté dans la Figure 1.2-7. Les données de séquençage *whole-exome* d'un cancer du rein chromophile de la cohorte du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) ont été utilisées¹¹⁴. L'axe correspondant à la valeur nulle de logR (en ordonnée) est la médiane des segments génomiques et matérialise la ploïdie de l'échantillon. La médiane est décalée vers le bas par rapport à un état diploïde 2-1 indiquant que le génome est globalement hypodiploïde (ploïdie inférée à 1.6). L'explication réside dans les nombreuses pertes clonales de chromosomes entiers (signature des cancers du rein chromophile). Nous observons également des monosomies sous-clonales. Les segments correspondant ne s'alignent pas avec les CNV clonaux. En utilisant les valeurs observées de logR et logOR pour chaque segment, les CCF $\widehat{\phi}_k$ ont pu être estimées.

La déconvolution clonale (Figure 1.2-8) individualise trois clusters aux repères $\widehat{\phi}_1 = 0.89$ capturant les monosomies clonales en $\{1,2,6,10,13,17,21\}$, $\widehat{\phi}_2 = 0.76$ capturant une monosomie sous-clonale du 11 et $\widehat{\phi}_3 = 0.65$ capturant les monosomies sous-clonales en $\{18,22\}$ d'apparition plus tardive dans l'évolution.

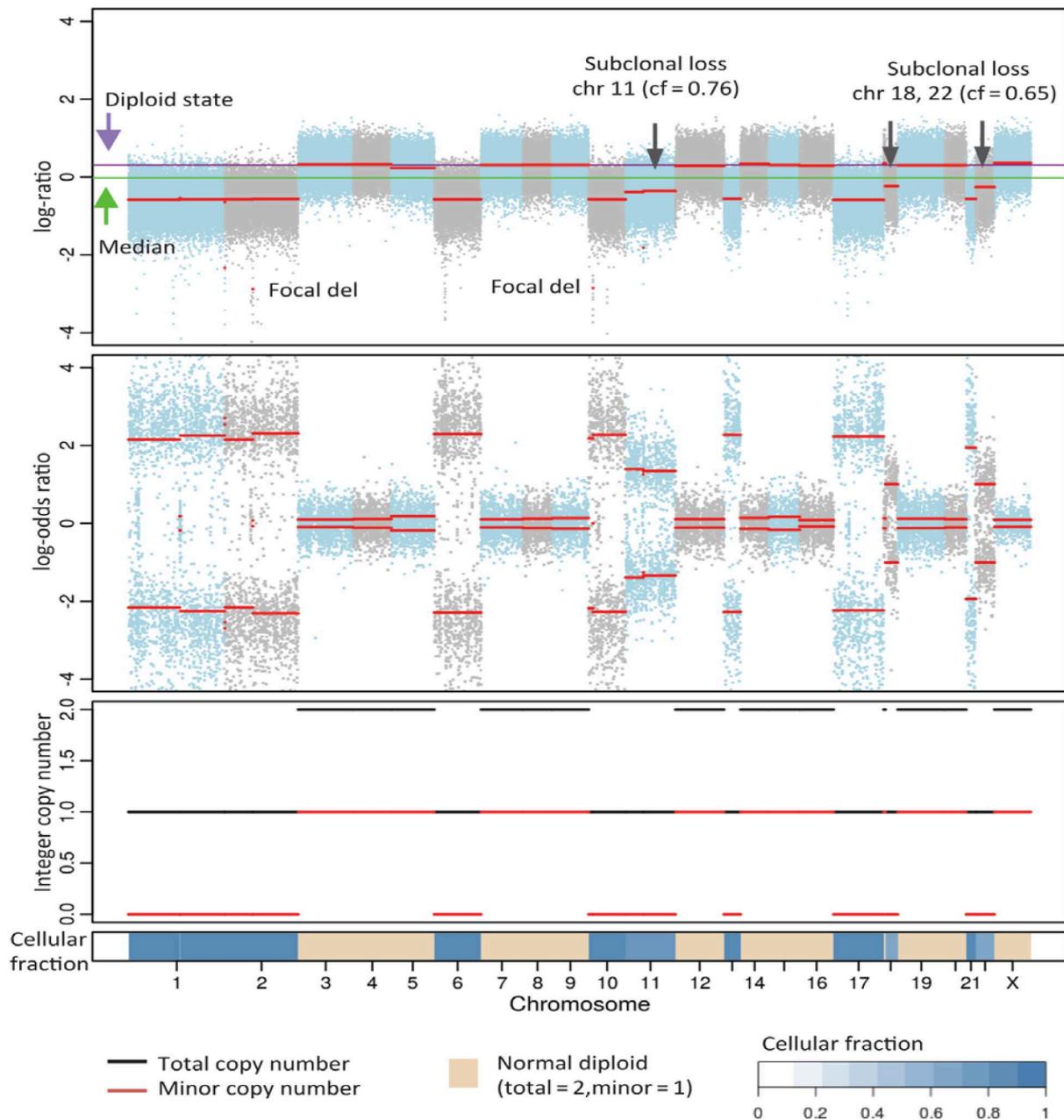


Figure 1.2-7 Sortie de logiciel FACETS.

Les résultats sont rendus sur des analyses de SNP homozygotes et hétérozygotes au niveau germinale. Les données générées proviennent du séquençage *whole-exome* d'un cancer du rein chromophile. De haut en bas : analyses *total copy number* (log ratio), *allelic copy number* (log odds ratio) et profils de CNV des segments génomiques récapitulant le nombre total de copies et le plus petit nombre de copie par segment. La CCF inférée est également rapportée et souligne la présence de CNV sous-clonaux. D'après Shen et Seshan¹¹³.

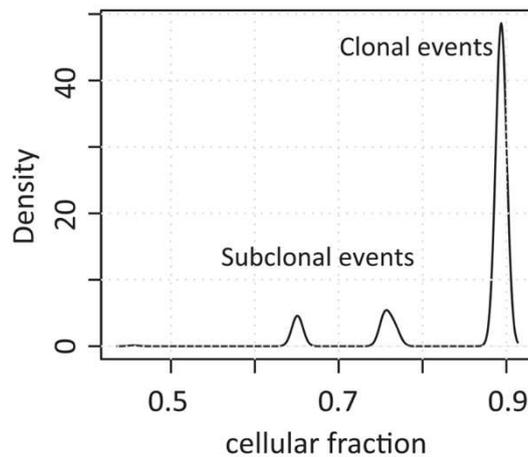


Figure 1.2-8 Densité de Kernel des CCF.

Les CCF correspondent à des événements de type CNV et ont été estimées par FACETS en utilisant de données de séquençage *whole exome* d'un cancer du rein chromophile. Les CCF représentent des événements clonaux (repère 0.89) et des événements sous-clonaux plus tardifs (repères 0.76 et 0.65). D'après Shen et Seshan¹¹³.

1.2.5 Principes phylogénétiques appliqués à la déconvolution clonale

La phylogénie moléculaire est l'étude des liens de parenté entre des séquences de nucléotides ou d'acides aminés. Ces liens de parenté peuvent également être étudiés à l'échelle des clones et des sous-clones tumoraux¹¹⁵. Les principes phylogénétiques exposent que la somme des CCF de deux clusters mutationnels dépendants (c'est-à-dire présents sur la même branche de l'arbre phylogénétique) est supérieure à 100% (*pigeonhole principle*) et qu'une progénie a toujours une CCF inférieure à celle de son ancêtre (*crossing rule*).

L'interprétation conjointe des mutations permet de résoudre les problèmes de topologie phylogénétique^{35,103} en identifiant des mutations qui ne peuvent pas apparaître en même temps dans une cellule (une mutation allélique et une délétion sous-clonale par exemple). Lorsque deux mutations proches sont sur un même *read* il devient possible d'affirmer leur appartenance à une même lignée cellulaire (Figure 1.2-9A). Les lignées cellulaires sont divergentes lorsque les mutations proches sont capturées par des *reads* indépendants (Figure 1.2-9B).

Les CNV peuvent être interprétés conjointement aux mutations ponctuelles pour inférer la chronologie des événements moléculaires en comparant la fréquence des mutations dans des régions amplifiées du génome aux fréquences théoriques d'un génome diploïde¹¹⁶. Il a pu être

montré dans les cancers du sein que les aberrations chromosomiques sont des évènements continus mais non ancestraux¹¹⁰. Une autre étude pan-cancer a rapporté que les délétions homozygotes de gènes suppresseurs de tumeur sont des évènements précoces contrairement à l'instabilité génétique plus tardive dans l'évolution¹¹⁷. Une déviation des valeurs de VAF permet enfin d'identifier des CNV sous-clonaux (Figure 1.2-9C-F).

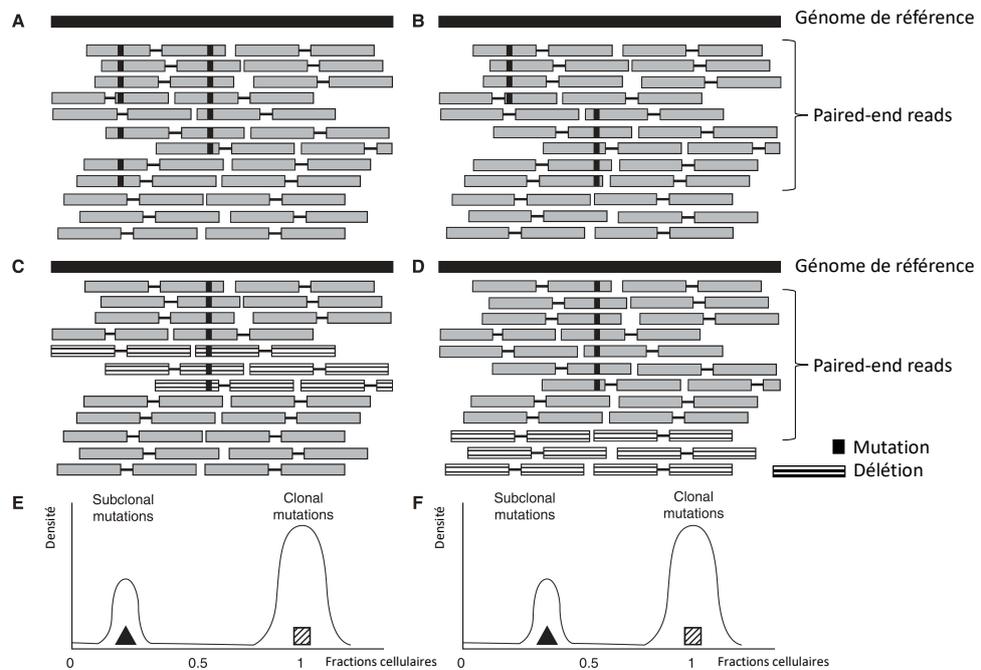


Figure 1.2-9 Principes phylogénétiques.

La figure illustre des *reads* (séquençage en *paired-end*) alignés sur un génome de référence (A-D). Les densités de Kernel des conjonctures (C) et (D) sont rapportées respectivement en (E) et (F). Figure adaptée de Dentre *et al.*¹⁰³

L'annotation parentale des SNP hétérozygotes permet de préciser l'origine des déséquilibres alléliques sous la forme de profils *en miroir* (Figure 1.2-10A)³⁹. L'identification de CNV ne partageant pas la même origine parentale est utile pour l'inférence clonale (Figure 1.2-10B). Ce déséquilibre allélique particulier est un marqueur d'instabilité chromosomique et d'évolution parallèle (Figure 1.2-10C).

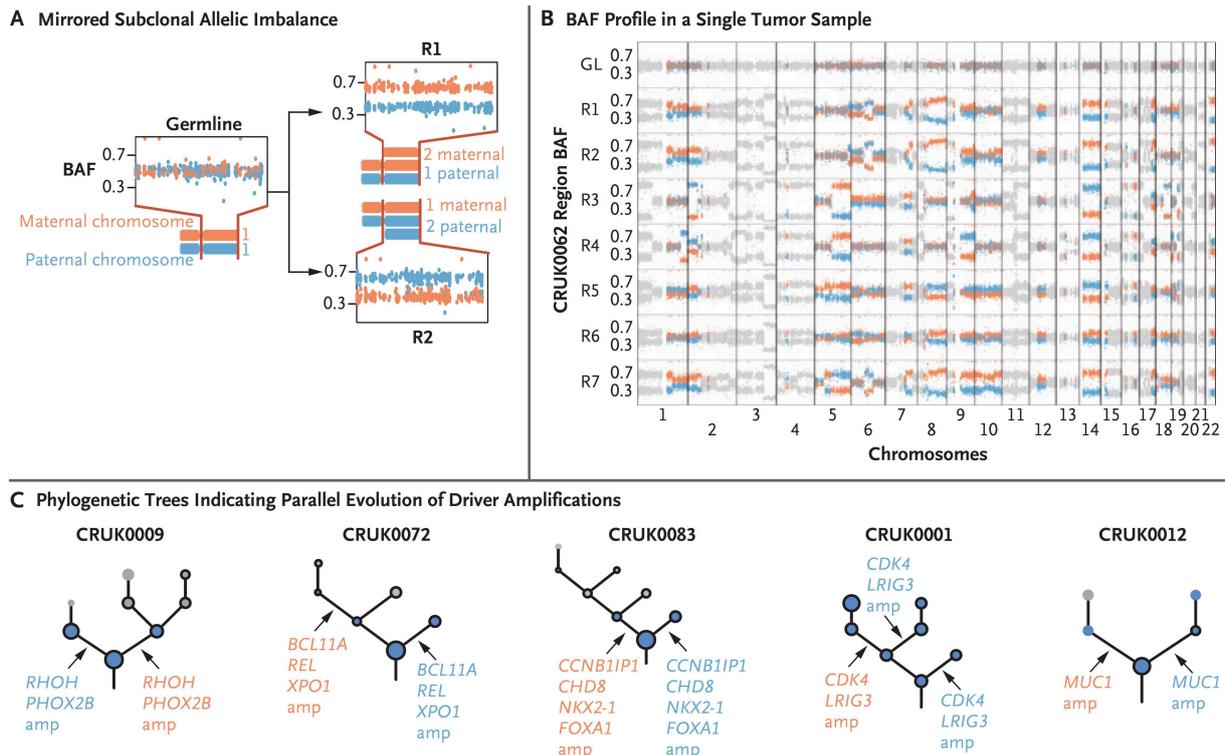


Figure 1.2-10 Déséquilibre allélique en miroir et inférence clonale.

(A) Calcul des BAF au niveau des SNP hétérozygotes au niveau germlinal. L'annotation des SNP permet de préciser l'origine parentale d'un CNV. R1 et R2 sont deux régions distinctes séquencées d'un CBNPC. (B) Profils de BAF obtenus dans plusieurs régions d'une tumeur (R1-7) et une région germinale (GL). (C) Arbres phylogénétiques de cinq CBNPC. Les déséquilibres alléliques en miroir individualisent des sous-clones et identifient des évolutions parallèles. D'après Jamal-Hanjani *et al.*³⁹

1.2.6 Apport des prélèvements multiples pour appréhender l'hétérogénéité tumorale

En routine clinique, une biopsie tumorale est le plus souvent réalisée en un seul endroit de la tumeur primitive au site le plus accessible et n'est pas répétée. Le geste est souvent morbide en raison de la localisation anatomique de la tumeur (par exemple, à proximité de gros vaisseaux), de la nécessité d'une anesthésie générale et des douleurs associées à la procédure. Les données de séquençage obtenues à partir d'une seule biopsie sous-estiment l'hétérogénéité spatiale et temporelle d'une tumeur contrairement au séquençage de prélèvements multiples (c'est-à-dire de plusieurs régions éloignées géographiquement dans une tumeur primitive, des ganglions régionaux et des métastases à distance)^{7,118,119}.

Les approches de séquençage multirégional permettent de mieux appréhender l'architecture clonale d'une tumeur (sa composition clonale et les liens de parenté entre les sous-clones) pour plusieurs raisons¹⁰³. Premièrement, un seul prélèvement tumoral ne permet pas de séparer deux clusters mutationnels de même CCF. Si les CCF diffèrent dans un autre prélèvement, les deux sous-clones peuvent être individualisés. Deuxièmement, lorsque les CCF sont faibles, les sous-clones peuvent être positionnés en plusieurs endroits de l'arbre phylogénétique. Par exemple, l'identification de deux clusters mutationnels à 50% et 40% peut amener différentes conclusions dans lesquelles les clusters pourront être indépendants (car la somme des CCF est inférieure à 100% d'après la règle du *pigeonhole*) ou le cluster à 40% pourra descendre du cluster à 50%. En appliquant la règle du *pigeonhole* sur plusieurs prélèvements, les topologies convergent vers une solution. Troisièmement, les prélèvements multiples permettent de rattraper un sous-clone indétectable voire absent d'un prélèvement et détectable dans un autre prélèvement à la faveur d'une augmentation de la cellularité tumorale ou de sa CCF.

L'approche de séquençage multirégional est utilisée dans les études TRACERx (*Tracking Cancer Evolution Through Therapy*) dont l'objectif principal est de caractériser la valeur pronostique de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale dans plusieurs sous-types tumoraux :

- Cohorte CBNPC (TRACERx Lung, <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01888601>)
- Cohorte cRCC (TRACERx Renal, <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03226886>)

L'hétérogénéité intra-tumorale y est étudiée sous l'angle de l'évolution. Cette étude est rendue possible en utilisant des cohortes prospectives de *biobanking* récapitulant l'histoire naturelle de la tumeur à différents *timepoints* (au moment de la chirurgie à visée curative, à la progression métastatique, à la progression tumorale sous traitement et en *post mortem*).

1.2.6.1 Travaux fondateurs sur les cancers du rein à cellules claires

Les approches de séquençage multirégional ont permis de démontrer historiquement l'existence d'une hétérogénéité génétique intra-tumorale sous la forme d'une évolution ramifiée des sous-clones. Les travaux fondateurs de l'équipe de Charles Swanton ont porté sur quatre patients atteints de cRCC⁷. Un séquençage *whole-exome* a d'abord été réalisé chez un premier patient d'emblée métastatique incluant le séquençage multirégional de la tumeur primitive, des métastases synchrones et de la pièce de néphrectomie avant et après exposition à l'everolimus (un inhibiteur de tyrosine kinase dirigé contre mTOR, Figure 1.2-11A). Les mutations ponctuelles détectées pouvaient être communes aux régions séquencées (ubiquitaires),

partagées entre plusieurs régions ou exclusives (Figure 1.2-11B). Au total, 69% des mutations ponctuelles retrouvées dans la pièce de néphrectomie étaient hétérogènes entre les régions. Les liens de parenté phylogénétique ont ensuite été inférés en appliquant une méthode d'ordonnancement clonal¹³ révélant une évolution ramifiée plutôt que linéaire (Figure 1.2-11C). Une région (R4) partageait des mutations avec la tumeur primitive et les métastases indiquant la coexistence de plusieurs sous-clones ancestraux (dont dérivent R4a et R4b). Ce constat était appuyé par l'identification d'une population cellulaire tétraploïde dans R4 et dans une région métastatique M2b (correspondant aux deux pics subtétraploïdes) suggérant que M2b et un sous-clone de R4 appartenaient à une même lignée cellulaire (Figure 1.2-11D).

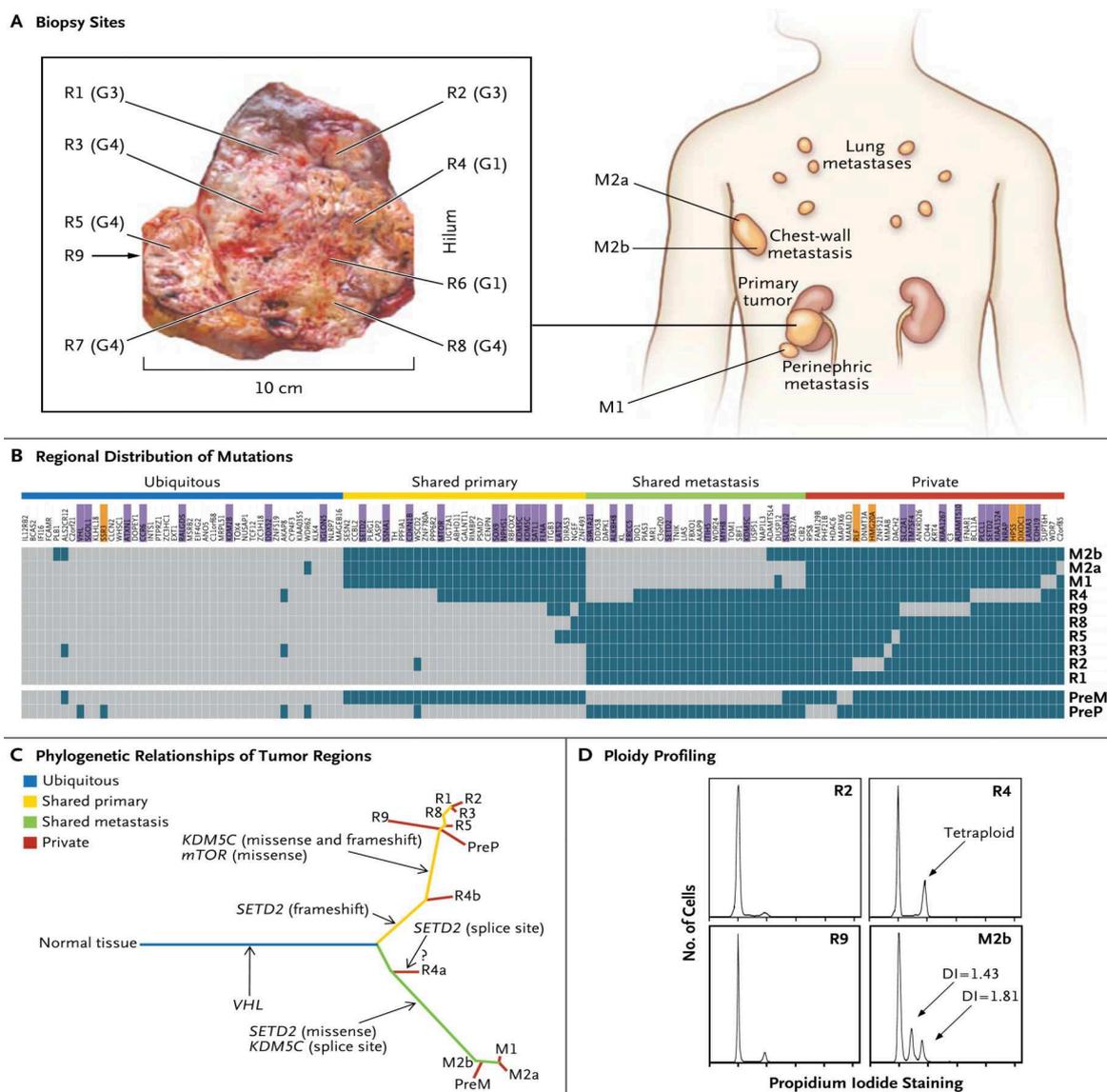


Figure 1.2-11 *Workflow* des analyses sur l'hétérogénéité génétique par séquençage multirégional dans le cancer du rein à cellules claires.

régions tumorales. Les mutations *driver* sont annotées à proximité de leur branche respective. D'après Gerlinger *et al.*⁷

1.2.6.2 Approche de séquençage multirégional dans TRACERx Lung

Les analyses de séquençage *whole-exome* chez les 100 premiers patients de TRACERx Lung ont été réalisées sur 327 régions tumorales correspondant à trois régions en valeur médiane (intervalle, 2-8) par patient³⁹. L'estimation des CCF a permis de classer les mutations ponctuelles et les CNV en altérations clonales et sous-clonales. L'hétérogénéité génétique intra-tumorale était omniprésente dans ces tumeurs avec respectivement 30% (intervalle, 0.5-93%) et 48% (intervalle, 0.3-88%) des mutations ponctuelles et des CNV classées sous-clonales soulignant la présence d'une instabilité génomique et chromosomique. Le séquençage multirégional du génome offrait une meilleure résolution de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale en reclassant 76% des mutations étiquetées clonales sur un seul prélèvement en mutations sous-clonales.

Les clusters mutationnels ont été secondairement établis pour chaque région tumorale et incorporés dans un arbre phylogénétique annoté pour les événements *driver* et les signatures mutationnelles (Figure 1.2-13). L'interprétation phylogénétique a ainsi révélé que des mutations *driver* de *TP53*, *KRAS*, et *EGFR* étaient clonales et précédaient un événement de doublement du génome. Des mutations sous-clonales plus tardives dans l'évolution ont pu être observées dans *PIK3CA* et dans des gènes de la régulation épigénétique.

Le séquençage d'un seul prélèvement tumoral ne produit qu'une mesure statique de la complexité chromosomique appréhendée par la fraction de génome tumoral affectée par des CNV (wGII, *weighted Genome Instability Index*)¹²⁰. L'approche de séquençage multirégional permet de souligner la nature dynamique de l'instabilité chromosomique et d'identifier les mécanismes par lesquels l'instabilité chromosomique crée de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale. Un mécanisme impliquant une évolution parallèle des sous-clones a pu être identifié en exploitant les déséquilibres alléliques en miroir (Figure 1.2-10). L'instabilité chromosomique peut également créer une hétérogénéité mutationnelle par la perte de segments de chromosome portant des mutations clonales. Ainsi, 13% (intervalle, 0-56%) des mutations sous-clonales identifiées dans une tumeur sont le résultat de CNV sous-clonaux.

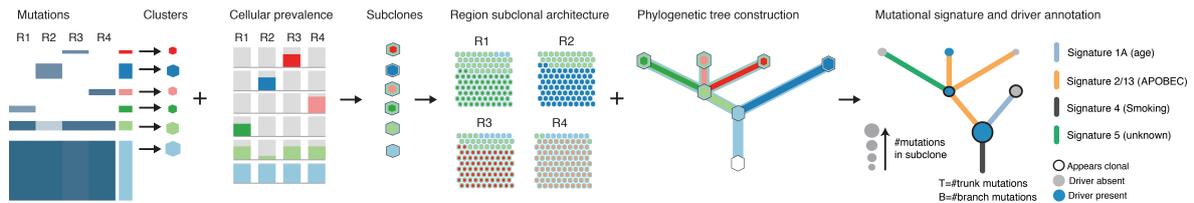


Figure 1.2-13 *Workflow* des analyses de déconvolution clonale et d'inférence phylogénétique par séquençage multirégional dans TRACERx Lung.

(A) En utilisant les données de séquençage *whole-exome* multirégional, il est possible de définir des clusters mutationnels pour chaque région séquencée (R1-4). Un cluster mutationnel clonal présent dans l'ensemble des régions tumorales est ancestral (présent dans le tronc de l'arbre phylogénétique). Les clusters mutationnels sous-clonaux partagés par plusieurs régions tumorales ou exclusifs sont portés par les branches. Les CCF intra-régionales de chaque cluster sont utilisées pour l'inférence phylogénétique. Les arbres sont finalement annotés pour les événements *driver* et les signatures mutationnelles. Figure adaptée de Jamal-Hanjani *et al.*³⁹

1.2.6.3 Approche de séquençage multirégional dans TRACERx Renal

Les analyses de NGS ciblé sur 101 patients de la cohorte TRACERx Renal (première analyse intermédiaire) ont été réalisées sur 1 206 régions tumorales correspondant à sept régions (intervalle, 3-75 régions) par tumeur⁴¹. La détection des variants ponctuels et des CNV affectant des gènes *driver* était supérieure à celle rapporté par des études de séquençage utilisant une seule biopsie¹²¹⁻¹²³. Cette différence s'expliquait par une meilleure détection des événements sous-clonaux (Figure 1.2-14).

D'autres équipes ont utilisé cette approche de séquençage multirégional confirmant l'omniprésence de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale dans un certain nombre de localisations tumorales incluant le thorax^{119,124}, les glandes mammaires^{125,126}, le système nerveux central^{127,128} et l'appareil digestif^{30,129}.

Pour conclure, mentionnons que des algorithmes bioinformatiques utilisés pour la déconvolution clonale sur prélèvement unique peuvent être utilisés pour des analyses sur prélèvements multiples incluant PyClone¹⁰⁴, SciClone¹⁰⁵ et CloneHD¹¹². Une méthode automatisée pour l'inférence phylogénétique et la construction des arbres est également disponible dans PhyloSub¹⁰⁷ et une version augmentée est disponible de manière à incorporer les mutations ponctuelles aux données de CNV dans PhyloWGS¹⁰⁶.

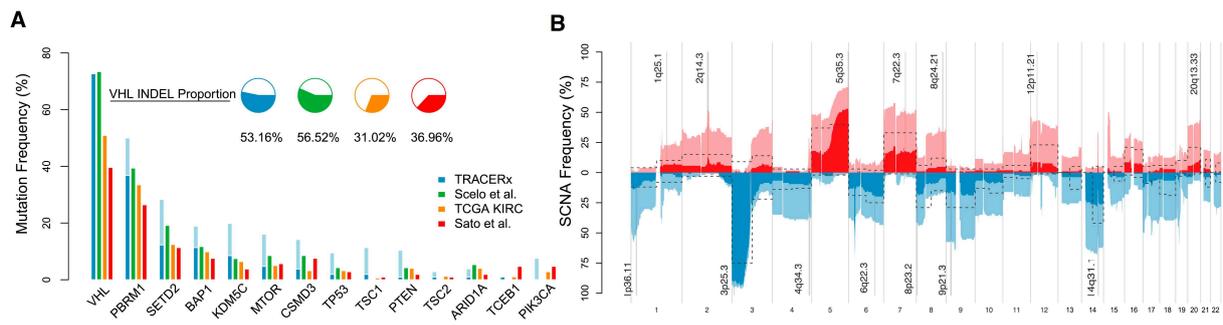


Figure 1.2-14 Analyse comparée des mutations ponctuelles et des CNV dans les cancers du rein à cellules claires selon différentes études incluant TRACERx Renal.

(A) Caractérisation des fréquences mutationnelles de 14 gènes *driver* rapportées dans TRACERx Renal (séquençage multirégional) et dans trois cohortes (TCGA KIRC¹²², Sato *et al.*¹²¹ et Scelo *et al.*¹²³ basées sur le séquençage d'une seule biopsie). Les mutations sous-clonales sont figurées en bleu pâle. (B) Fréquence des CNV dans TRACERx Renal. Les CNV *driver* sont également indiqués par région génomique. Les évènements sous-clonaux sont figurés par des couleurs pâles. Les pointillés indiquent les fréquences observées dans la cohorte TCGA KIRC. Figure adaptée de Turajlic *et al.*⁴¹

1.2.7 Séquençage sur cellules individuelles

Le perfectionnement des méthodes de NGS permet aujourd'hui d'envisager la lecture du génome d'une seule cellule (SCA) grâce notamment à la mise au point de systèmes d'amplification du génome entier qui assurent une représentation équilibrée des séquences présentes dans l'échantillon de départ¹³⁰. Cette amplification est cependant limitée par des biais techniques de représentation du génome (défaut de couverture, pertes alléliques)¹³¹ et de détection de mutations ponctuelles¹³².

L'approche de SCA a été utilisée dans un premier temps pour évaluer les profils de CNV moins sujet aux biais techniques. Différentes améliorations méthodologiques permettent aujourd'hui d'accéder aux mutations ponctuelles et de poser la question de l'hétérogénéité à ce niveau^{133,134}. La résolution cellulaire de la technique permet d'appréhender des sous-clones sous le seuil de détection des approches de *bulk sequencing* et s'affranchit de l'étape de déconvolution clonale²².

L'hétérogénéité intra-tumorale et les liens de parenté phylogénétique peuvent être appréhendés en utilisant les données de séquençage de SCA. Le SCA décrit les lignées cellulaires avec une

résolution parfaite en quantifiant l'abondance de tous les variants et en identifiant les co-occurrences des mutations. Pour l'illustrer, nous nous appuyons sur les travaux fondateurs menés par les équipes du MD Anderson et du Dana Farber dans des cancers du sein (sous-types luminaux A et triple négatifs). Ces tumeurs étaient naïves de (chimio)radiothérapie. Les résultats de séquençage ont été obtenus à partir de noyaux isolés par cytométrie en flux à la phase G2/M (tétraploïdes). Chaque noyau contenait l'équivalent de 12 pg d'ADN. Les génomes ont été amplifiés selon la méthode MDA (*Multiple Displacement Amplification*)¹³⁵ pour pouvoir construire la librairie. Le séquençage *whole-exome* a été réalisé sur une machine Illumina.

Les profils de CNV générés à partir de cellules triple négatives ont identifié deux populations. La diversité était donc limitée indiquant que les CNV ont eu lieu assez tôt dans l'évolution. L'analyse des séquences sur 16 cellules tumorales triple négatives et 16 cellules normales isolées (Figure 1.2-15A) a montré en revanche des profils très diversifiés. La plupart des mutations observées en *bulk sequencing* (374 mutations, popT) ont été retrouvées dans chaque cellule tumorale (h1-8 et a1-8) mais avec des différences notables de l'une à l'autre. Des mutations non observées par séquençage global (car trop minoritaires) ont été vues dans les cellules individuelles avec de nouveau des différences entre les cellules. Les cellules normales (popN et n1-16) ne montraient aucune mutation à une exception près. Les profils ont pu être regroupés en fonction de leur similitude en trois classes H, A1 et A2.

On en arrive donc à une image de tumeur qui évolue (en l'absence de toute pression de sélection due à un traitement) d'abord par réarrangements chromosomiques puis par des mutations ponctuelles accumulées au fil des divisions cellulaires (Figure 1.2-15B). La masse tumorale est hétérogène et cette diversité est persistante au niveau infra-clonal.

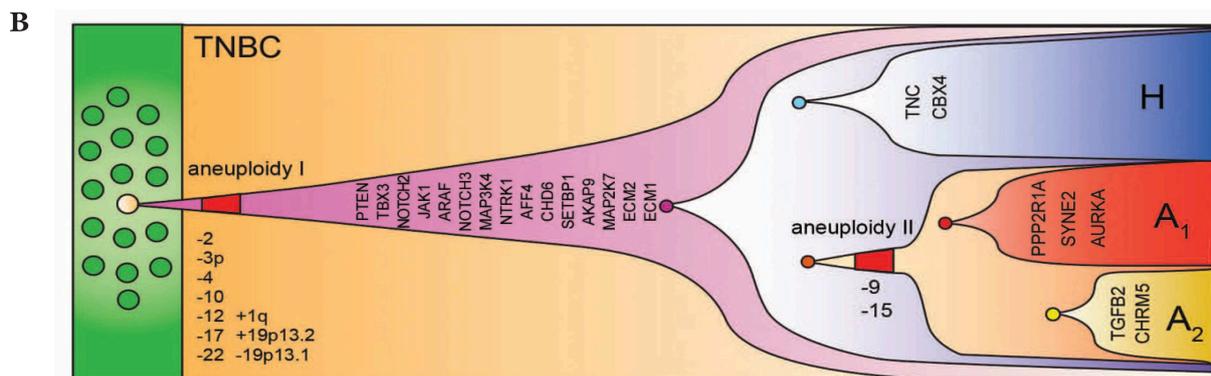
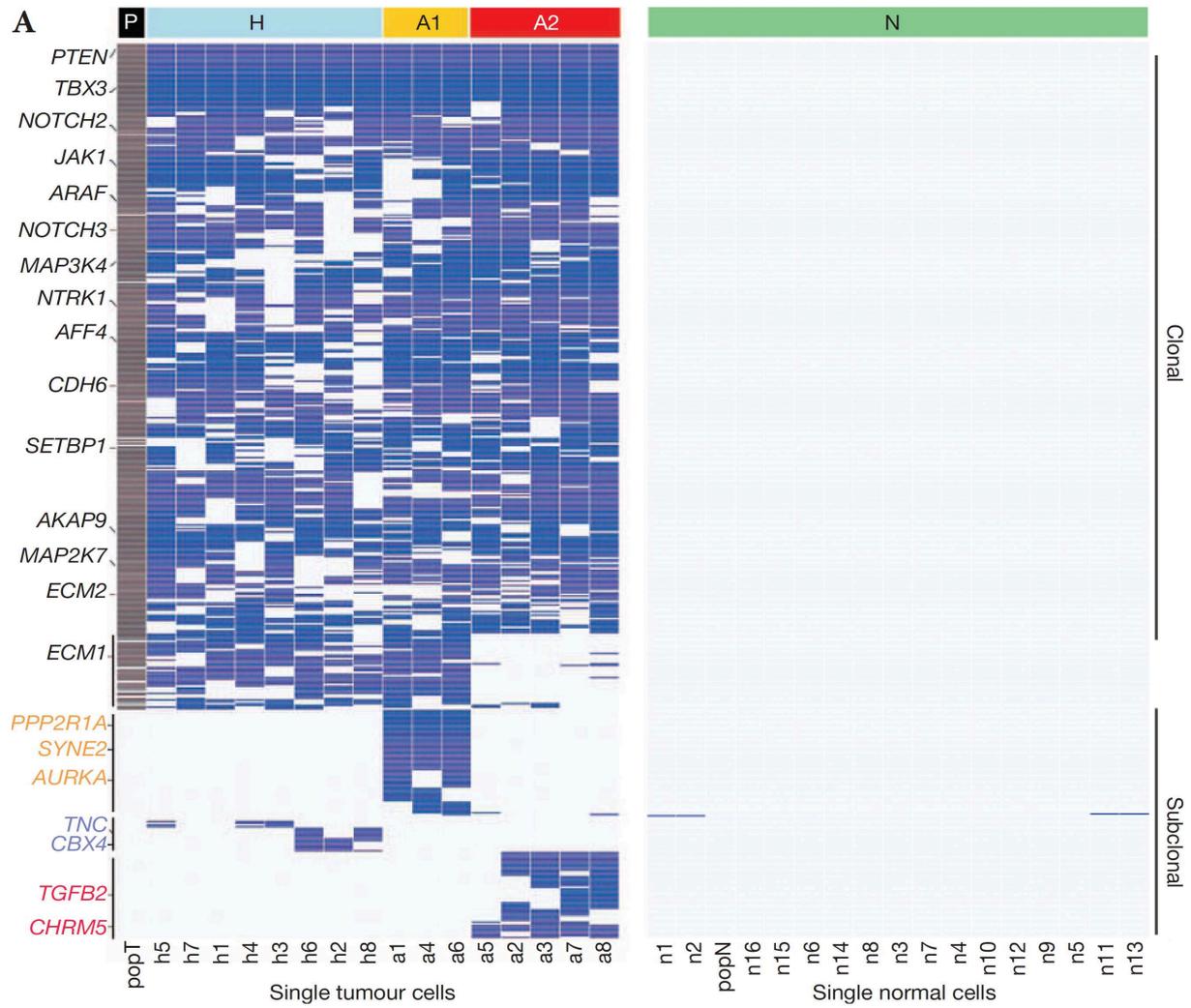


Figure 1.2-15 Séquençage sur cellules individuelles dans un cancer du sein triple négatif.

(A) Mutations observées dans plusieurs cellules tumorales et dans des cellules témoins non mutées. (B) Modèle d'évolution clonale d'un TNBC inféré en utilisant les données de SCA et de CNV. D'après Wang *et al.*¹³⁶

1.2.8 Apport de l'ADN tumoral circulant pour traquer l'évolution clonale

A défaut d'une quantité résiduelle de tissu disponible avec des biopsies de petite taille pour le séquençage des tumeurs, les biopsies liquides et en particulier l'ADN tumoral circulant (ctDNA) peuvent être utilisées. Les biopsies liquides ont l'avantage d'être peu invasives et peuvent être répétées au cours de l'évolution du cancer sous traitement. Le ctDNA correspond à de l'ADN double brin circulant dans le plasma sous forme libre d'origine tumorale. L'ADN plasmatique tumoral porte les anomalies moléculaires présentes dans la tumeur primitive ou dans les métastases (mutations ponctuelles, translocations, amplifications et méthylations) ainsi que leurs évolutions au cours du temps.

L'utilité en clinique du ctDNA est très large, du dépistage à la prédiction de l'efficacité d'un traitement et de la rechute sous traitement. La détection d'une maladie résiduelle minimale après une chirurgie à visée curative est également un enjeu majeur de ces biomarqueurs circulants. Une meilleure stratification du risque postopératoire permettant de proposer à bon escient une thérapie adjuvante potentiellement toxique.

Une lecture phylogénétique des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression tumorale est possible en utilisant le ctDNA. Pour l'illustrer, nous présentons les travaux menés dans le cadre des consortiums TRACERx et PEACE (*Posthumous Evaluation of Advanced Cancer Environment*, <http://clinicaltrials.gov/study/NCT03004755>) sur les 100 premiers patients de la cohorte CBNPC¹³⁷. Les arbres phylogénétiques établis à partir des données de séquençage *whole-exome* multirégional de CBNPC localisés dans le cadre de TRACERx Lung³⁹ ont été exploités pour générer des panels personnalisés couvrant entre 25 et 30 variants ponctuels. Ces variants provenaient de clusters mutationnels identifiés comme étant clonaux ou sous-clonaux dans la tumeur primitive (Figure 1.2-16). Les ctDNA ont été extraits du plasma à différents *timepoints* avant et après chirurgie. Les régions d'intérêt ont été amplifiées par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) multiplex pour cibler et enrichir la librairie. Le séquençage des amplicons a été réalisé sur une machine Illumina.

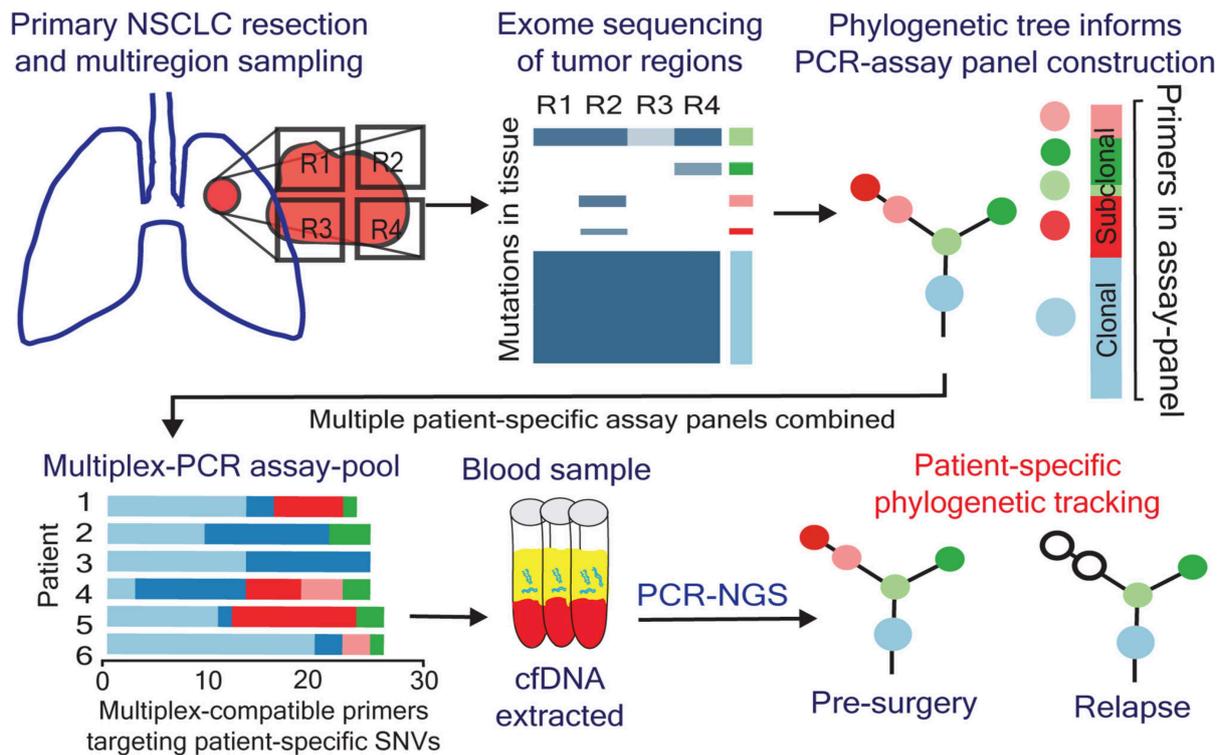


Figure 1.2-16 *Workflow* des analyses d'inférence phylogénétique des récurrences par séquençage de l'ADN tumoral circulant dans TRACERx Lung.

D'après Abbosh et al.¹³⁷

Le séquençage des ctDNA sériés a permis de suivre l'évolution des sous-clones et de proposer une interprétation phylogénétique des récurrences chez 24 patients incluant 14 récurrences (Figure 1.2-17). En séquençant les métastases, les panels ciblés générés à partir des tumeurs primitives ont été élargis (Figure 1.2-18). En particulier, un variant *OR5D18* présent dans une métastase paravertébrale du patient CRUK0063 et détecté dans plusieurs prélèvements plasmatiques a pu être rattaché à un sous-clone de la tumeur primitive présent dans une seule région (R3). Cette approche permettait également de résoudre des problèmes de topologie phylogénétique. Plusieurs mutations étiquetées clonales étaient finalement absentes des métastases hépatiques du patient CRUK0035 indiquant un branchement évolutif manqué par le séquençage multirégional de la tumeur primitive.

Les sous-clones sélectionnés à progression chez le patient CRUK0063 étaient suivis rétrospectivement en utilisant un panel ciblé de 103 variants ponctuels. Les variants ponctuels provenaient d'un cluster mutationnel clonal (20 variants) et de neuf clusters mutationnels sous-clonaux (4 à 15 variants par cluster) identifiés dans les métastases par séquençage multirégional *post mortem*. Trois clusters mutationnels étaient présents dans toutes les métastases et six

clusters étaient exclusivement présents dans l'une d'elle. En séquençant le ctDNA à différents *timepoints*, une maladie résiduelle minimale était détectable 151 jours après la chirurgie et précédait la récurrence clinique de 315 jours. Parmi les variants détectés au moment de la rechute, 18 étaient présents dans toutes les métastases et deux étaient exclusivement présents dans l'une d'elle.

En définitive, le séquençage ciblé du ctDNA à l'aide d'un panel NGS personnalisé a rendu possible (i) une interprétation phylogénétique de la progression tumorale, (ii) le suivi des sous-clones sélectionnés par les métastases et (iii) la détection d'une maladie résiduelle minimale indiquant une validité clinique de la méthode (implémentée dans le test Signatera¹³⁸).

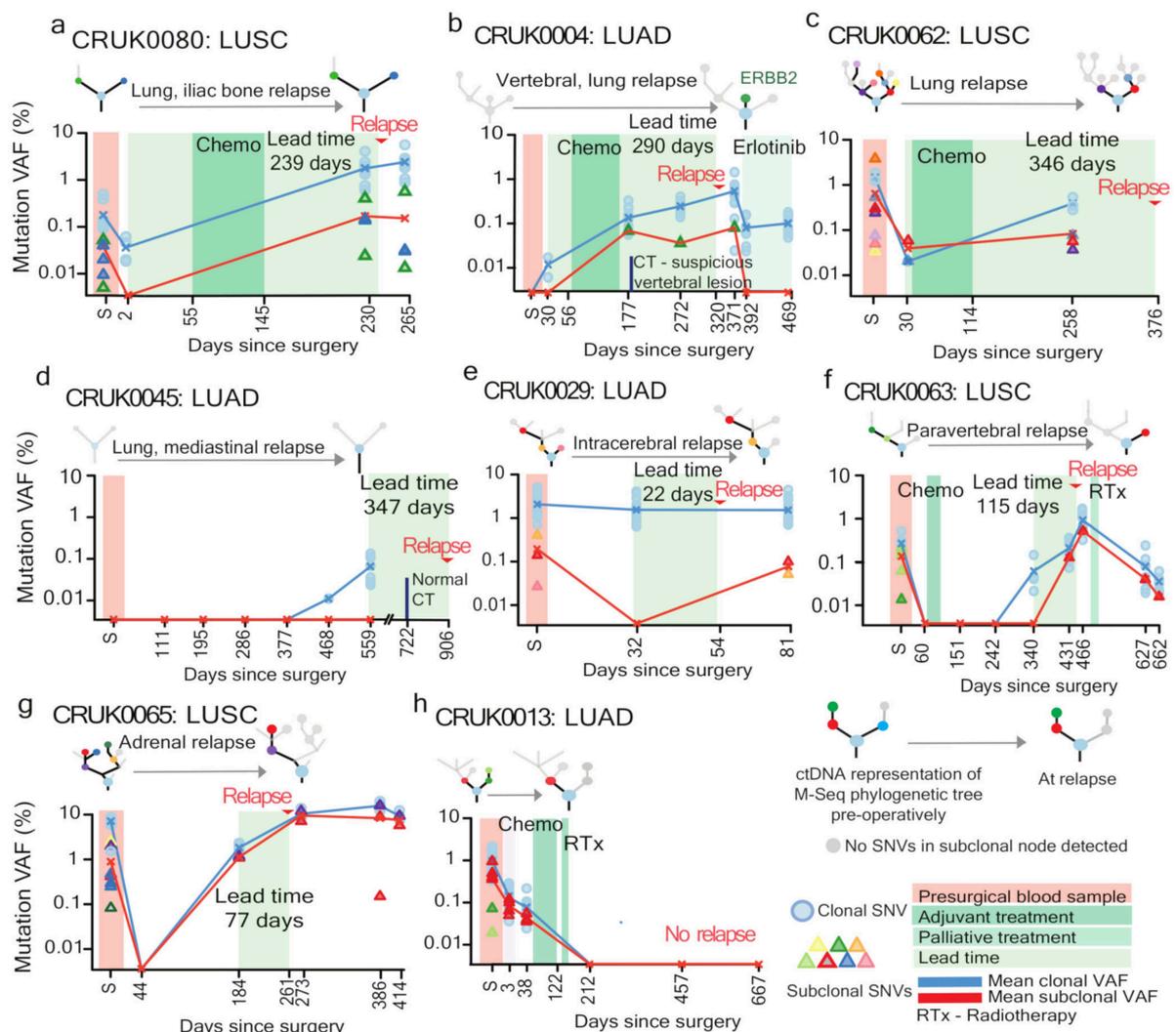


Figure 1.2-17 Séquençage ciblé des ctDNA sériés dans TRACERx Lung.

Les arbres phylogénétiques sont rapportés avant chirurgie, à récurrence (a-g) et en l'absence de progression (h). D'après Abbosh et al.¹³⁷

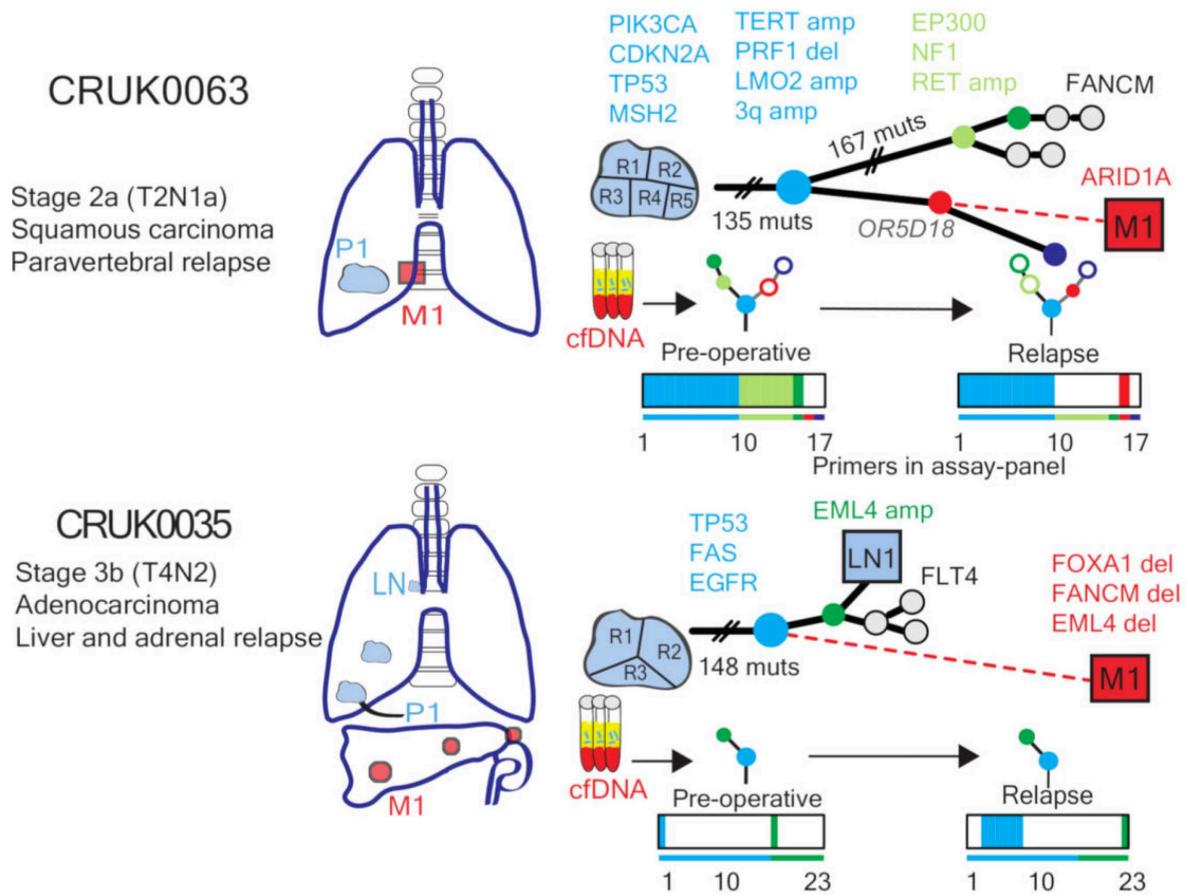


Figure 1.2-18 Evolution clonale à progression capturée par séquençage ciblé du ctDNA dans TRACERx Lung.

Les résultats sont montrés pour un carcinome épidermoïde bronchique (CRUK0063) et un adénocarcinome bronchique (CRUK0035). D'après Abbosh *et al.*¹³⁷

1.3 Impact clinique de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale

1.3.1 Caractérisation pronostique de l'hétérogénéité intra-tumorale dans TRACERx

La valeur pronostique de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale a été évaluée prospectivement dans le cadre des études TRACERx Lung et TRACERx Renal. Il s'agissait de l'objectif principal à partir duquel les nombres de sujets nécessaires ont été calculés garantissant la robustesse des résultats¹³⁹. L'hétérogénéité génétique y est appréhendée en estimant les CCF des mutations ponctuelles et des CNV et en caractérisant le nombre et la proportion d'altérations moléculaires clonales et sous-clonales par tumeur. L'approche de séquençage multirégional du génome permettait d'appréhender l'hétérogénéité intra-tumorale de façon plus précise en capturant d'avantage de sous-clones cellulaires. En appliquant des méthodes clonales de déconvolution et d'ordonnancement, l'hétérogénéité génétique a pu être étudiée sous l'angle de l'évolution.

1.3.1.1 Résultats de TRACERx Lung

Dans TRACERx Lung, les survies ont été estimées en stratifiant les patients selon la proportion de mutations sous-clonales supérieure ou inférieure aux valeurs médianes de la cohorte (30% pour les mutations ponctuelles et 48% pour les CNV)³⁹. La survie sans progression n'était pas impactée par la proportion de mutations sous-clonales (Figure 1.3-1A).

La survie des patients avec une proportion élevée de CNV sous-clonaux étaient moins bonne en comparaison des patients avec une proportion inférieure à la médiane de la cohorte (Figure 1.3-1B). Cette association se vérifiait après ajustement sur des variables pronostiques usuelles dans les CBNPC. Ce résultat fondamental de TRACERx Lung a permis de souligner l'importance clinique de l'instabilité chromosomique lorsqu'elle opère au cours du temps. Des événements de doublement du génome majoritairement clonaux (indiquant leur acquisition précoce dans l'évolution) ont été identifiés dans 76% des CBNPC. Ces événements moléculaires adaptatifs atténuent l'effet des mutations somatiques délétères, propagent l'instabilité chromosomique et représentent finalement un biomarqueur pronostic péjoratif^{42,109,140}.

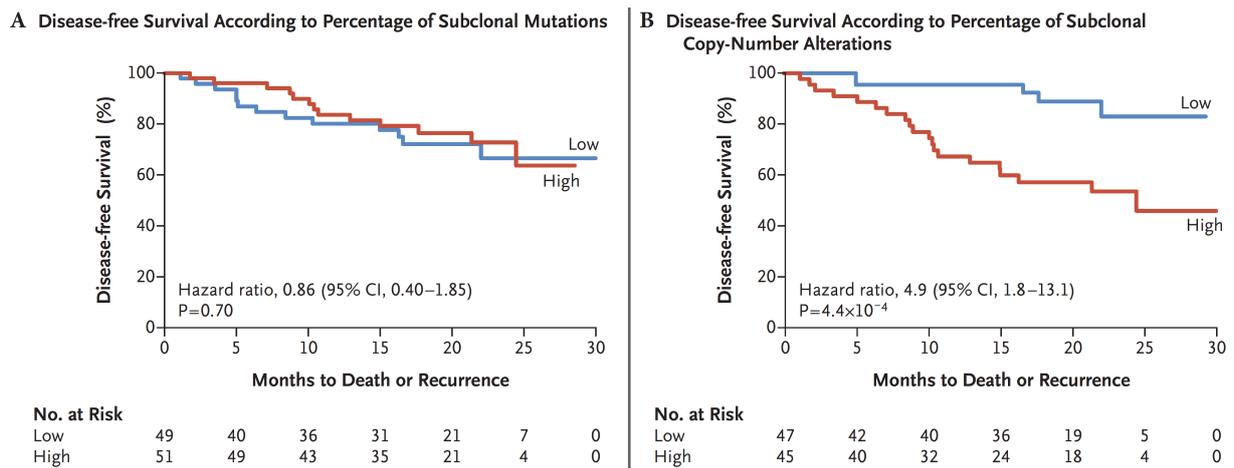


Figure 1.3-1 Impact pronostique de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale sur la survie sans progression dans TRACERx Lung.

Les sous-groupes ont été comparés avec un test du log-rank pour les mutations ponctuelles (A) et les CNV (B). D'après Jamal-Hanjani *et al.*³⁹

1.3.1.2 Résultats de TRACERx Renal

Dans la première analyse intermédiaire de TRACERx Renal, un index a permis de récapituler l'hétérogénéité génétique intra-tumorale en calculant le ratio du nombre d'altérations sous-clonales par le nombre d'altérations clonales⁴¹. Le séquençage était restreint à ~110 gènes *driver* de telle sorte que l'index d'hétérogénéité et l'inférence phylogénétique ont été établis sur un petit nombre de biomarqueurs génomiques.

Les auteurs ont montré une association entre l'index d'hétérogénéité et des variables pronostiques usuelles dans les cRCC (incluant la taille de la tumeur primitive, son stade, le grade de Fuhrman et la présence de nécrose). La diversité clonale augmentait également avec le stade tumoral et le grade de Fuhrman.

Sept trajectoires évolutives ont été individualisées (Figure 1.3-2) suggérant la nature déterministe de l'évolution qui opère dans l'histoire naturelle des cRCC. Une expansion clonale de multiples mutations *driver* (*VHL*, *SETD2* et *BAP1*) prédisposait à des tumeurs homogènes avec un index d'hétérogénéité faible et une fixation précoce et clonale d'un haut niveau d'aneuploïdie. Ces tumeurs partageaient des critères histopronostiques péjoratifs (incluant un index de prolifération Ki67 élevé, une prévalence importante de tumeurs Fuhrman 4 et d'embolies vasculaires) et un délai médian de survie sans récurrence de 4.7 mois. Inversement, une expansion clonale de *PBRM1* prédisposait à des tumeurs hétérogènes avec un index

d'hétérogénéité fort, un haut niveau d'aneuploïdie sous-clonale et des événements moléculaires convergents indiquant des évolutions parallèles. Les critères histopronostiques étaient moins péjoratifs et le délai médian de survie sans récurrence était plus long (11.7 mois).

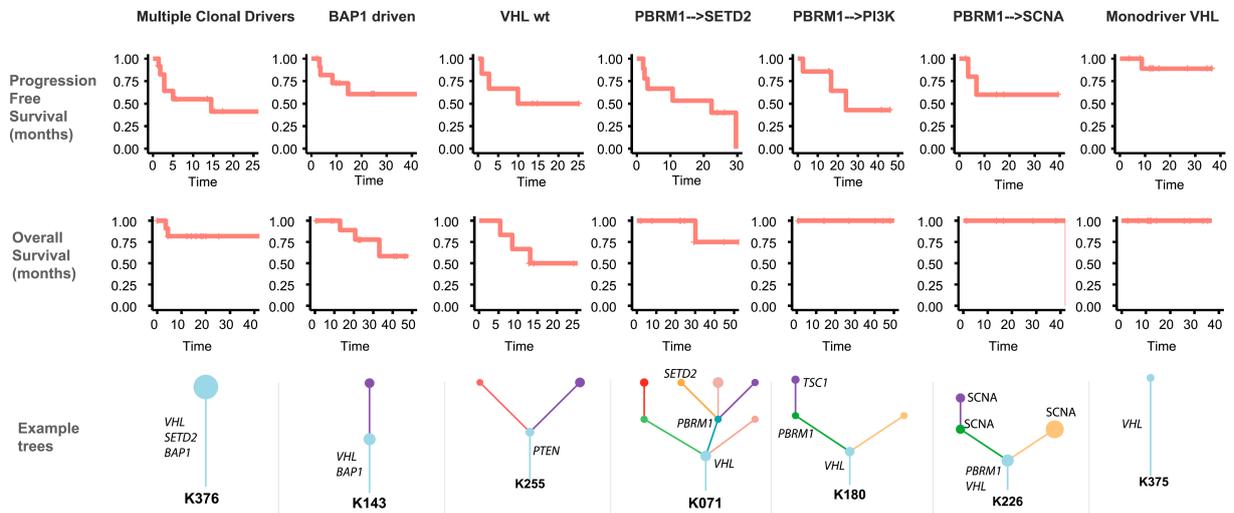
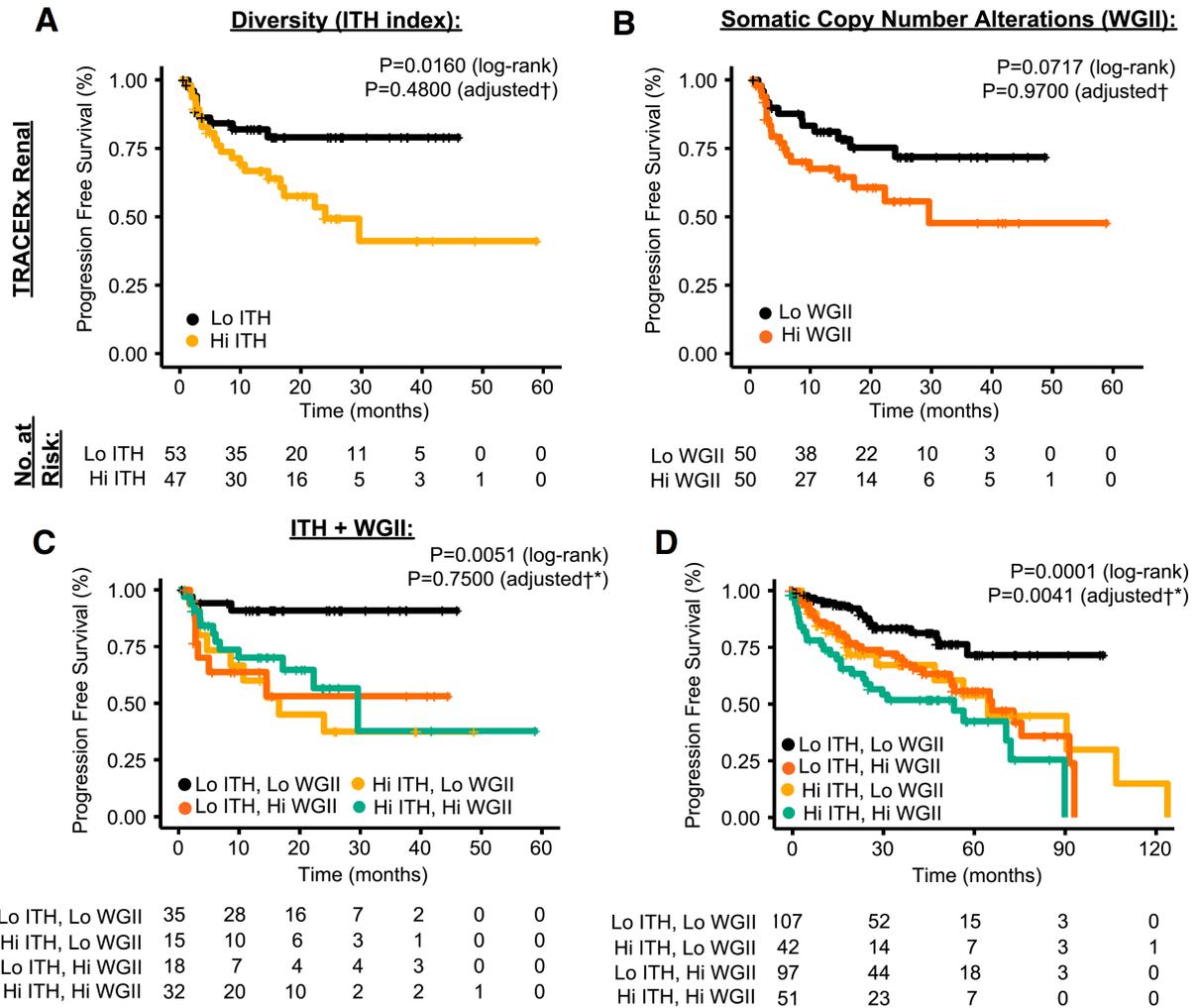


Figure 1.3-2 Caractérisation pronostique de sept trajectoires évolutives établies chez 63 patients de la cohorte TRACERx Renal.

Pour chacune des sept trajectoires, un arbre phylogénétique est rapporté à titre d'illustration. Figure adaptée de Turajlic et al.⁴¹

Au-delà de la caractérisation des trajectoires évolutives, la valeur pronostique de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale a été étudiée. Un impact négatif sur la survie sans récurrence a pu être montré bien que cette association ne se vérifie pas en analyse multivariée (Figure 1.3-3A). En raison du lien observé entre un niveau élevé d'aneuploïdie et des trajectoires évolutives agressives, l'effet de la complexité chromosomique (appréhendée par la proportion de génome affecté par des CNV et mesurée par l'index wGII) sur la survie sans progression a également été étudié. La complexité chromosomique était mesurée pour chaque région tumorale et la valeur de wGII la plus élevée était retenue de manière à capturer l'effet du sous-clone cliniquement pertinent. Cet effet sur la survie sans progression est revenu non significatif en analyse univariée (Figure 1.3-3B).

En combinant l'index d'hétérogénéité intra-tumorale au wGII, les auteurs ont pu établir que les profils évolutifs homogènes avec un haut niveau de complexité chromosomique étaient globalement de mauvais pronostic et disséminaient rapidement (Figure 1.3-3C-D).



† All adjusted values are derived using a Cox proportional hazard model, including stage + grade as covariates

* P value for "Hi ITH, Hi WGII" vs "Lo ITH, Lo WGII" (the most significantly different groups for PFS in adjusted analysis)

Figure 1.3-3 Impact pronostique de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale dans TRACERx Renal.

Les effets de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale mesurée par un index et de la complexité chromosomique mesurée par l'index wGII sur la survie sans progression sont montrés en (A) et (B) respectivement. Les effets de la combinaison sur la survie sans progression et la survie globale sont montrés en (C) et (D). Les sous-groupes pronostiques sont comparés en utilisant un test du log-rank et des modèles de Cox ajustés sur les variables pronostiques usuelles dans les cRCC. Figure adaptée de Turajlic *et al.*⁴¹

1.3.2 Impact pronostique de l'instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique est un déterminant de l'évolution tumorale et de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale qui agit en propageant des sous-clones aneuploïdes caractérisés par une importante diversité de caryotypes et de mutations ponctuelles. Son importance a d'abord été montrée dans les cRCC^{41,141} et dans les CBNPC³⁹ avant d'être formellement démontrée par une étude pan-cancer sur 394 tumeurs primitives et leurs métastases appariées¹⁴². L'hétérogénéité des CNV était un marqueur d'instabilité chromosomique opérant au cours de l'évolution. Cette étude a aussi mis en évidence des évolutions parallèles et en particulier des CNV convergents incluant des gains en 5p15.33 et 8q24.1 (affectant *TERT* et *MYC* respectivement). Les auteurs ont montré que des CNV sous-clonaux identifiés dans les tumeurs primitives affectant *CCND1* et *MYC* étaient sélectionnés dans les métastases.

L'association entre l'instabilité chromosomique et la survie n'est pas monotone (Figure 1.3-4). Des modèles murins avec une mutation inactivatrice hétérozygote du gène codant la protéine E associée au centrosome (*Cenp-e*^{+/-}) ont permis de préciser cette association *in vivo*. Les souris *Cenp-e*^{+/-} développaient plus de tumeurs de la rate et du poumon en comparaison des souris *Cenp-e*^{+/+}. L'induction de la tumorigenèse (chimique ou génétique) était freinée chez les souris *Cenp-e*^{+/-} contrairement aux souris sauvages¹⁴³. L'instabilité chromosomique pouvait à la fois promouvoir et freiner la croissance tumorale faisant écho à la théorie de l'effondrement mutationnel¹⁴³. Cette théorie prévoit l'extinction d'une population asexuée secondaire à l'accumulation de mutations délétères¹⁴⁴. Appliquée au cancer, la théorie prévoit que l'instabilité chromosomique favorise la croissance tumorale au détriment de la survie jusqu'à un certain seuil. Une instabilité chromosomique excessive freine la croissance tumorale et améliore paradoxalement le pronostic (Figure 1.3-4)¹⁶. Cette théorie a pu être vérifiée par une étude pan-cancer sur plus de 2000 échantillons tumoraux montrant qu'un niveau modéré d'instabilité chromosomique était associé à un pronostic péjoratif alors que des tumeurs avec un niveau excessif d'instabilité chromosomique étaient de meilleurs pronostics¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Ces résultats ont été récapitulés dans les cancers sévères de haut grade de l'ovaire¹⁴⁸ et dans une autre étude pan-cancer recouvrant 12 sous-types tumoraux¹⁴⁹.

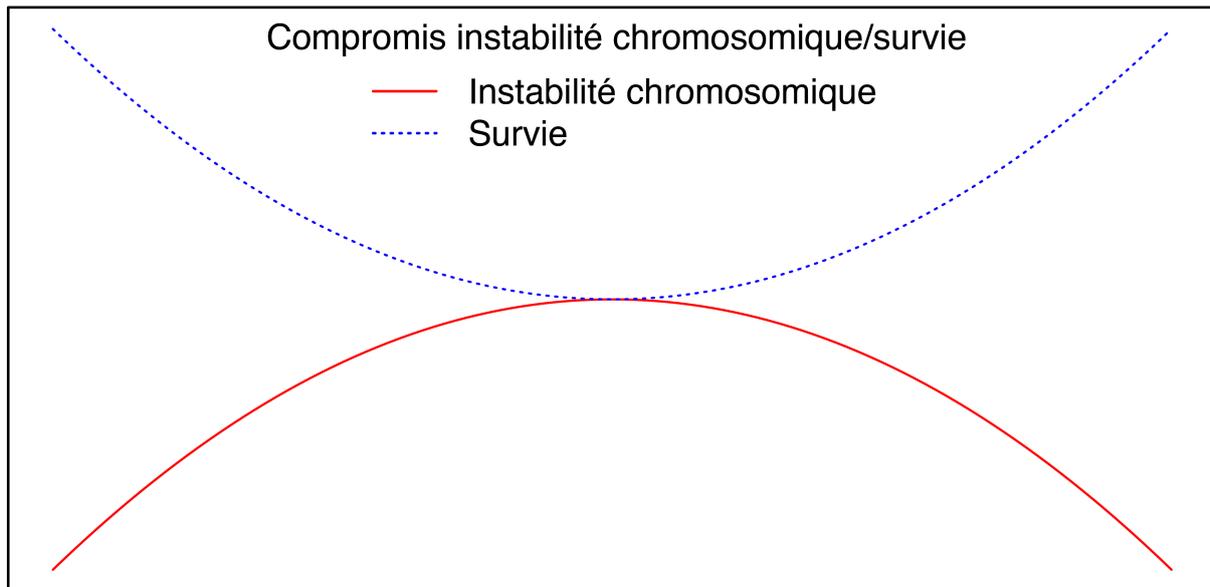


Figure 1.3-4 Théorie de l'effondrement mutationnel appliquée au cancer.

L'avantage sélectif de l'instabilité chromosomique sur les cellules tumorales est contrebalancé par un niveau excessif d'aneuploïdie. Les courbes ont été générées dans R en utilisant une fonction polynomiale de degré 2 définie par $f(x) = ax^2$, de paramètres $a = 1$ (pour l'instabilité chromosomique) et $a = -1$ (pour la survie).

1.3.3 Impact de l'hétérogénéité intra-tumorale sur la médecine de précision

La médecine de précision (également appelée médecine personnalisée) est bâtie sur le postulat que la croissance et la survie des cellules tumorales sont dépendantes de *drivers* oncogéniques potentiellement ciblables. Par exemple, l'utilisation de l'imatinib dans la leucémie myéloïde chronique addicte à la translocation *BCR-ABL* permet d'obtenir des taux de survie à 10 ans de $\sim 85\%$ ¹⁵⁰. La présence au sein d'une même tumeur d'une diversité de sous-clones portant des *drivers* oncogéniques différents, des mutations de résistance primaire et le potentiel adaptatif qui en résulte sont des obstacles au déploiement d'une médecine de précision¹⁷.

La charge mutationnelle exprimée en nombre de mutations par mégabase d'ADN séquencé (TMB) contribue au développement de résistance sous thérapie ciblée comme cela a été montré dans des CBNPC mutés *EGFR*¹⁵¹. Ces mutations peuvent apparaître *de novo*¹⁵² ou être déjà présentes à l'initiation du traitement dans des sous-clones minoritaires^{80,81} (Figure 1.2-1). Leur détection au moment du diagnostic est liée à la nature du prélèvement tissulaire et à la profondeur de séquençage. Des modèles mathématiques intégrant la taille lésionnelle mesurée radiologiquement à progression estiment à ~ 10 le nombre de sous-clones résistants dans des

lésions tumorales cliniquement détectables¹⁵³. Chez des patients sous ibrutinib pour une leucémie myéloïde chronique, la résistance était attribuable à l'émergence de mutations dans *BTK* et *PLCG2* détectables 15 mois avant la progression clinique¹⁵⁴. La résistance peut également être polyclonale conduisant à une expansion parallèle des sous-clones génotypiquement avanta-gés^{23,155,156}.

L'hétérogénéité génétique qui existe au niveau des *drivers* oncogéniques ciblables peut altérer la réponse à la thérapie ciblée. L'amplification clonale de *FGFR2* dans le cancer de l'estomac prédisait l'efficacité d'un inhibiteur sélectif de FGFR (AZD4547) contrairement à l'amplification sous-clonale¹⁵⁷.

Plusieurs pistes ont pu être proposées pour améliorer la réponse aux thérapies ciblées¹⁶ :

- Le ciblage des *drivers* oncogéniques présents dans le tronc de l'arbre phylogénétique et par conséquent dans toutes les cellules malignes^{158,159} ;
- Le ciblage des mutations impliqués dans des évolutions parallèles indiquant des contraintes oncogéniques imposées à l'évolution tumorale^{21,160,161} ;
- L'utilisation d'une thérapie adaptative alternant augmentation et réduction pour permettre le maintien d'un clone cellulaire sensible au traitement freinant un clone cellulaire résistant (interférence clonale)^{28,162} ;
- L'utilisation d'une thérapie séquentielle définie par l'ajustement des thérapies ciblées aux mutations de résistance détectées dans les biopsies solides ou liquides¹⁶³.

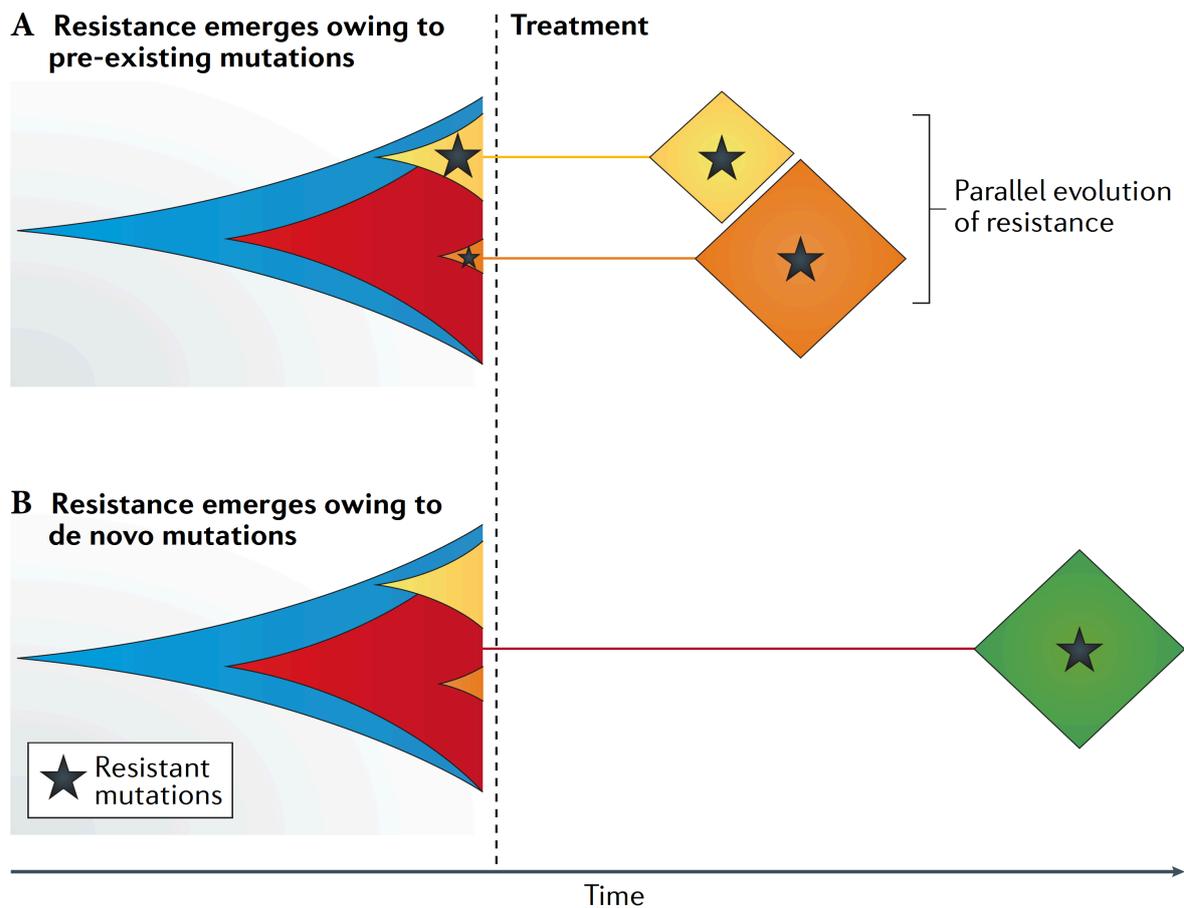


Figure 1.3-5 Modèles d'évolution clonale sous la pression thérapeutique.

(A) Des sous-clones minoritaires (jaune et orange) portent des mutations de résistance qui ne confèrent aucun avantage sélectif avant traitement (évolution neutre). Les sous-clones sensibles (bleu et rouge) disparaissent sous traitement et les sous-clones résistants s'expandent parallèlement (sélection positive). (B) Une mutation de résistance *de novo* confère un avantage sélectif sous traitement et une fixation du sous-clone. L'émergence de la résistance est alors plus tardive dans l'évolution. D'après Turajlic *et al.*¹⁶⁴

1.4 Hétérogénéité génétique intra-tumorale des cancers de la tête et du cou

1.4.1 Généralités sur les cancers de la tête et du cou

1.4.1.1 Épidémiologie

Les cancers de la tête et du cou regroupent des tumeurs développées aux dépens de la cavité orale, de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx¹⁶⁵. Plus rarement, elles trouvent leurs origines dans le nasopharynx, la cavité nasale, les sinus paranasaux et les glandes salivaires.

Les cancers de la tête et du cou arrivent en septième position des cancers les plus fréquents dans le monde en 2018 (890 000 nouveaux cas et 450 000 décès)¹⁶⁶. Traditionnellement diagnostiqués chez des patients âgés éthylo-tabagiques, ces cancers liés à une exogénose connaissent un déclin en partie dû à la diminution de la consommation de tabac^{167,168}. Inversement, les cancers de l'oropharynx liés aux papillomavirus humains (HPV) à hauts risques sont en augmentation dans les populations nord-américaines et d'Europe du nord reflétant une latence de développement de 10 à 30 ans après contamination^{168,169}.

En excluant les cancers de la peau et de la thyroïde, plus de 90% des cancers de la tête et du cou sont des carcinomes épidermoïdes (CETC)¹⁷⁰. Les autres histologies regroupent les adénocarcinomes, les sarcomes et les lymphomes.

Dans les deux dernières décennies, les HPV oncogènes (principalement 16 et 18) ont émergé comme un facteur de risque pour une proportion significative de CETC. L'HPV est cliniquement significatif dans les carcinomes épidermoïdes de l'oropharynx diagnostiqués chez des patients plus jeunes et moins exposés au tabac¹⁷¹. En France, la prévalence de l'HPV à haut risque dans les cancers de l'oropharynx détecté par la caractérisation en immunohistochimie du statut p16 (un marqueur *surrogate* de la présence d'HPV) et la détection de l'ADN viral par hybridation *in situ* est de 37.7%¹⁷². Bien que ces cancers se présentent souvent au diagnostic à un stade clinique avancé en lien avec un envahissement ganglionnaire, leur pronostic est plutôt favorable en comparaison des CETC non viro-induits^{172,173}. De meilleures réponses sont obtenues sous (chimio)radiothérapie chez des patients avec un état général conservé. Ces résultats ont d'ailleurs conduit à l'incorporation d'une classification dédiée aux cancers de l'oropharynx liés à HPV dans une édition augmentée du manuel AJCC (8^{ème} édition) en 2017^{174,175}. Le groupe coopérateur ICON-S a secondairement validé l'utilité pronostique de cette 8^{ème} édition^{176,177}.

1.4.1.2 Panorama moléculaire

Les données de NGS générées par des groupes coopérateurs (incluant le TCGA) ou des initiatives individuelles (incluant l'initiative *Chicago HNC Genomics Cohorts*) ont permis de mieux caractériser les altérations moléculaires récurrentes et actionnables et de mieux comprendre les différences selon les étiologies (Figure 1.4-1)^{178,179}.

Dans les CETC liés à une exogénose, les altérations moléculaires actionnables recouvrent essentiellement la voie des récepteurs à activité tyrosine kinase (*EGFR* [15%], *FGFR1-3* [14%], *HER2* [5%], *PIK3CA* [34%] et *HRAS* [5%]) et la voie du cycle cellulaire (mutations de *TP53* [70%], amplifications de *CCND1* [20-30%] et inactivations de *CDKN2A* [80-90%]).

Dans les cancers de l'oropharynx liés à HPV où les oncoprotéines virales E6 et E7 inactivent respectivement p53 et RB1, des mutations activatrices et des amplifications de *PIK3CA* sont rapportées dans 56% des cas^{178,180,181}.

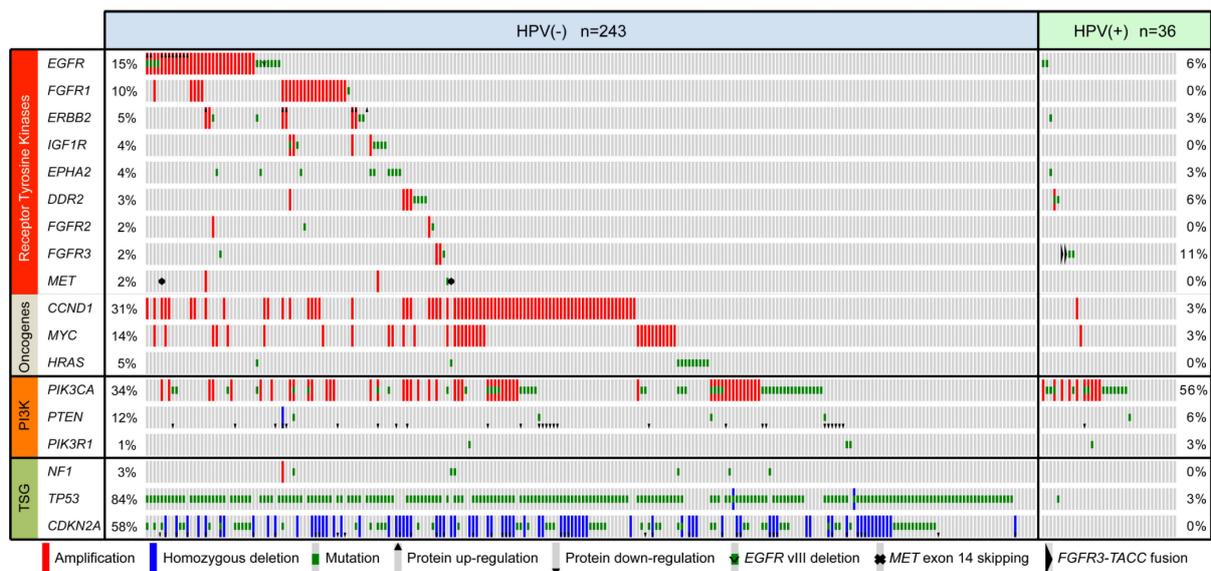


Figure 1.4-1 Données de séquençage *whole-exome* de 279 carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou de la cohorte TCGA, Nature 2015.

Le statut HPV était défini par la caractérisation en immunohistochimie du statut p16 ou par la détection de l'ADN viral par hybridation *in situ* dans des cancers de l'oropharynx. Les altérations moléculaires actionnables ou dans des gènes *driver* sont rapportées. D'après le consortium TCGA¹⁷⁸.

Dans un effort de synthèse et de hiérarchisation des altérations moléculaires actionnables dans les CETC, j'ai publié au cours de ma première année de thèse de sciences et sous la supervision des Professeurs Ivan Bièche et Christophe Le Tourneau une classification basée sur les niveaux de preuves disponibles dans la littérature et implémentée selon les recommandations de l'ESMO (*European Society for Medical Oncology*)¹⁸². L'article intitulé *Genomic Alterations in head and neck squamous cell carcinoma: level of evidence according to ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT)* est disponible en Annexe 4.1.1.

1.4.1.3 Stratification pronostique

Actuellement, la stratégie thérapeutique prend uniquement en compte la localisation anatomique et le stade de la maladie à défaut d'intégrer dans les algorithmes de prise en charge son étiologie sous-jacente (une exogénose ou une infection par un HPV à haut risque) et ses caractéristiques moléculaires¹⁸³.

Trente à quarante pour cent des patients sont diagnostiqués à un stade précoce de la maladie (stade I ou II de la classification AJCC¹⁷⁴). Ces tumeurs sont accessibles à un traitement unimodal, chirurgical ou de radiothérapie exclusive. Des survies prolongées sont obtenues chez 70% à 90% des patients¹⁸³. Soixante pour cent des patients sont diagnostiqués à un stade localement avancé (stade III ou IV de la classification AJCC¹⁷⁴). Le taux de récurrence locale y est plus important (15 à 40%) grevant le pronostic de ces tumeurs avec une survie à cinq ans inférieure à 50%¹⁸⁴. Ces tumeurs requièrent des traitements combinés associant chimiothérapie, radiothérapie et chirurgie¹⁸⁵. Dans les cancers de l'oropharynx localement avancés et liés à HPV, des survies prolongées sont obtenues chez 80% des patients¹⁷³. Les données disponibles dans la littérature sont toutefois insuffisantes pour recommander un changement voire une désescalade thérapeutique potentiellement délétère en survie^{186,187}.

Malgré les progrès de la chirurgie et de la radiothérapie en modulation d'intensité, plus de 50% des patients atteints initialement d'un cancer localement avancé développent une maladie récurrente et/ou métastatique dans les trois ans¹⁸⁵. Le pronostic des récurrences locales inopérables ou en territoire irradié est sombre et similaire au pronostic des récurrences à distance (6 à 9 mois en l'absence de traitement)^{188,189}.

1.4.1.4 Thérapies ciblées et biomarqueurs théranostiques

La famille des récepteurs au facteur de croissance épidermique humain (HER/EGFR/ErbB, *Human Epidermal Growth Factor Receptor*) est composée de quatre éléments : ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, et ErbB4/HER4^{190,191}. Ces récepteurs occupent un rôle pivot dans la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la compétence métastatique en assurant la transduction de signaux oncogéniques et l'activation des voies PI3K/Akt et MAPK. EGFR est surexprimé dans la plupart des carcinomes épidermoïdes et détecté à la surface des cellules tumorales dans plus de 90% des CETC^{192,193}. Les thérapies ciblées anti-EGFR reposent sur l'utilisation (i) d'anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine extracellulaire du récepteur et interférant avec la fixation du ligand (incluant le cetuximab) ou (ii) de petites molécules inhibitrices dirigées contre le domaine catalytique à activité tyrosine kinase des récepteurs (incluant le gefitinib ou l'afatinib)^{194,195}. Les mécanismes d'action et de résistance vis-à-vis de ces deux classes thérapeutiques sont bien distincts ce qui pourrait expliquer la différence d'efficacité rapportée en clinique.

Dans les CETC, les effets antitumoraux du cetuximab sont gouvernés par une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), une sensibilisation aux agents de chimiothérapie, une inhibition de la croissance cellulaire et une stimulation des voies pro-apoptotiques. La fixation du cetuximab à l'EGFR induit également une internalisation et une dégradation de l'EGFR^{196,197}. Le cetuximab en association à la radiothérapie a démontré un bénéfice en survie globale en comparaison de la radiothérapie seule (passant de 29.3 mois à 49.0 mois) chez des patients atteints de CETC localement avancés et inéligibles aux platines¹⁹⁸. Le cetuximab est également approuvé en association aux platines en première ligne de récurrence et/ou métastatique sur la base d'un gain en survie globale et sans récurrence associé à une augmentation du taux de réponse objective¹⁹⁹. En monothérapie dans les CETC réfractaires aux platines, le taux de réponse objective est de 13% avec un délai médian jusqu'à progression de 70 jours indiquant l'acquisition rapide d'une résistance au traitement²⁰⁰. Plusieurs mécanismes de résistance primaire ou adaptative ont été évoqués incluant l'activation parallèle d'autres récepteurs de la famille ErbB potentiellement *druggables* par des inhibiteurs de tyrosine kinase^{197,201}.

La première génération d'inhibiteurs réversibles de tyrosine kinase de l'EGFR (incluant le gefitinib et l'erlotinib) a été utilisée avec succès dans les CBNPC présélectionnés sur des mutations de sensibilisation *EGFR* (incluant des délétions de l'exon 19 et la mutation L858R de l'exon 21). Ces mutations sont rarement détectées dans les CETC et l'activité du gefitinib dans des tumeurs récurrentes et/ou métastatiques demeure modeste avec un taux de réponse objective de seulement 10.6% et un délai médian jusqu'à progression de 3.4 mois²⁰².

L'afatinib est un inhibiteur irréversible de tyrosine kinase pan-HER de deuxième génération avec une affinité supérieure vis-à-vis des récepteurs EGFR sauvages et mutés (incluant la mutation de résistance T790M) et des récepteurs HER2/HER4²⁰³. L'afatinib n'a pas démontré une supériorité par rapport au cetuximab en termes de taux de réponse objective (8.1% vs 9.7%, respectivement) chez des patients atteints de CETC récurrents et/ou métastatiques réfractaires aux platines²⁰⁴. Des données précliniques suggèrent que l'association du cetuximab à un inhibiteur pan-HER pourrait être plus efficace qu'une monothérapie²⁰⁵.

Contrairement aux CBNPC pour lesquels des mutations de sensibilisation aux inhibiteurs de tyrosine kinase (incluant la mutation L858R) sont rapportées^{206,207}, aucun biomarqueur d'efficacité n'est actuellement disponible dans les CETC. Un essai de phase II randomisé (LUX-Head and Neck 1) comparant l'afatinib au méthotrexate dans des CETC en deuxième ligne métastatique a montré une supériorité de l'afatinib en termes de survie sans progression (2.6 mois vs 1.7 mois, respectivement) sans traduction sur la survie globale²⁰⁸. Les analyses translationnelles ont permis d'identifier des sous-groupes de CETC p16 négatifs, HER3 faibles, PTEN forts (en immunohistochimie) et EGFR amplifiés (en hybridation *in situ* fluorescente) de meilleurs pronostics sous afatinib bien que le gain en survie sans progression reste marginal (inférieur à 1.5 mois pour tous les sous-groupes)²⁰⁹. La valeur prédictive de l'amplification d'EGFR couplée au statut p16 négatif ou à l'absence d'exposition préalable au cetuximab est actuellement étudiée dans une étude pilote prospective de l'EORTC portant sur une stratégie thérapeutique personnalisée basée sur des biomarqueurs ou une immunothérapie dans les CETC avancés (essai UPSTREAM, <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03088059>). Les biomarqueurs prédictifs de sensibilité à l'afatinib identifiés dans les analyses translationnelles de LUX-Head and Neck 1 n'ont pas été confirmés dans l'essai de fenêtre d'opportunité de l'EORTC conduit chez des patients atteints de CETC localisés et opérables dans le *setting* préopératoire²¹⁰.

1.4.1.5 Immunothérapie

L'étude des mécanismes par lesquels les cancers échappent à l'immunovigilance a permis de révéler le rôle des points de contrôle immunitaire (également appelés *checkpoints*) qui inhibent la réponse immunitaire incluant CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*), PD-1 (*Programmed cell Death 1*) et PD-L1 (*Programmed cell Death-Ligand 1*). Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire sont des anticorps thérapeutiques qui ciblent ces co-sigaux inhibiteurs entre cellules tumorales ou cellules présentatrices d'antigènes et lymphocytes T activant ou réactivant une immunité cellulaire T anti-tumorale. L'immunothérapie représente

un des piliers de la prise en charge des CETC récurrents et/ou métastatiques notamment avec l'arrivée de deux inhibiteurs de PD-1 (le nivolumab et le pembrolizumab) récemment approuvés par la FDA et l'EMA²¹¹⁻²¹³.

Le nivolumab en monothérapie est approuvé sans présélection sur le statut PD-L1 dans les CETC réfractaires aux platines. Le pembrolizumab en association aux platines et au 5-FU ou en monothérapie est approuvé en première ligne métastatique en fonction du statut PD-L1.

1.4.2 Méthode utilisée pour la revue de la littérature

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons réalisé une revue exhaustive de la littérature disponible sur l'hétérogénéité génétique intra-tumorale dans les CETC incluant des articles publiés en langue anglaise depuis 2013 dans PubMed. Les résultats sont résumés dans le Tableau 1.4-1 et le Tableau 1.4-2.

L'équation de recherche avec opérateurs booléens était la suivante: (heterogeneity OR clonal OR (sub clonal) OR evolution) AND ((whole-exome sequencing) OR (whole-genome sequencing) OR (single-cell sequencing) OR (next-generation sequencing) OR (multi-region sequencing) OR (ultra-deep sequencing) OR TP53) AND ((head and neck cancer) OR HNC OR HNSCC OR SCCHN OR (squamous cell carcinoma)).

1.4.3 Hétérogénéité génétique mesurée par dispersion des fréquences alléliques

Les premières estimations d'une hétérogénéité génétique intra-tumorale ont été établies sur une seule biopsie en utilisant des données de séquençage *whole-exome* et en calculant un paramètre statistique robuste mesurant la dispersion des VAF (*MATH*, *Mutant-Allele Tumor Heterogeneity*). Dans une tumeur hétérogène, cette dispersion est supérieure à celle d'une tumeur homogène tandis que la valeur de VAF médiane est inférieure (Figure 1.4-2)²¹⁴.

Ce paramètre exploite la médiane des déviations absolues *MAD* et la médiane des VAF $median_{vaf}$ tel que :

$$MATH = 100 \times \frac{MAD}{median_{vaf}} \quad (14)$$

Son estimation permet de s'affranchir de la nécessité d'identifier et d'énumérer les clusters mutationnels. En outre, il n'est pas sensible aux valeurs extrêmes (correspondant soit aux mutations rares soit aux mutations présentes dans toutes les cellules ou aux CNV) et reste

valable pour des distributions éloignées de la loi normale. La formulation (14) prend en compte de manière implicite les données de CNV ainsi que la présence de cellules non mutées présentes dans l'échantillon.

Le paramètre a été testé sur une cohorte de 74 patients atteints de CETC bien annotée cliniquement et pour laquelle les données de séquençage *whole-exome* étaient disponibles¹⁸⁰. Les valeurs de MATH étaient supérieures parmi les tumeurs avec une mutation *disruptive* de *TP53* (une mutation tronquante ou modifiant la polarité dans le domaine de fixation de la protéine en L2/L3 ou affectant un site d'épissage)²¹⁵.

Les valeurs de MATH étaient également supérieures parmi les tumeurs non liées à HPV. Une explication résiderait dans le fait que les CETC liés à HPV sont moins mutés que les CETC non viro-induits^{180,216}. Les oncoprotéines virales E6 et E7 inactivent respectivement p53 et RB1 épargnant l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur de la voie du cycle cellulaire²¹⁷. Les auteurs ont étendu la comparaison aux tumeurs négatives pour HPV et non mutées pour TP53 afin d'éliminer un facteur confondant de *TP53*¹⁸⁰ et ont pu vérifier que cette différence était maintenue.

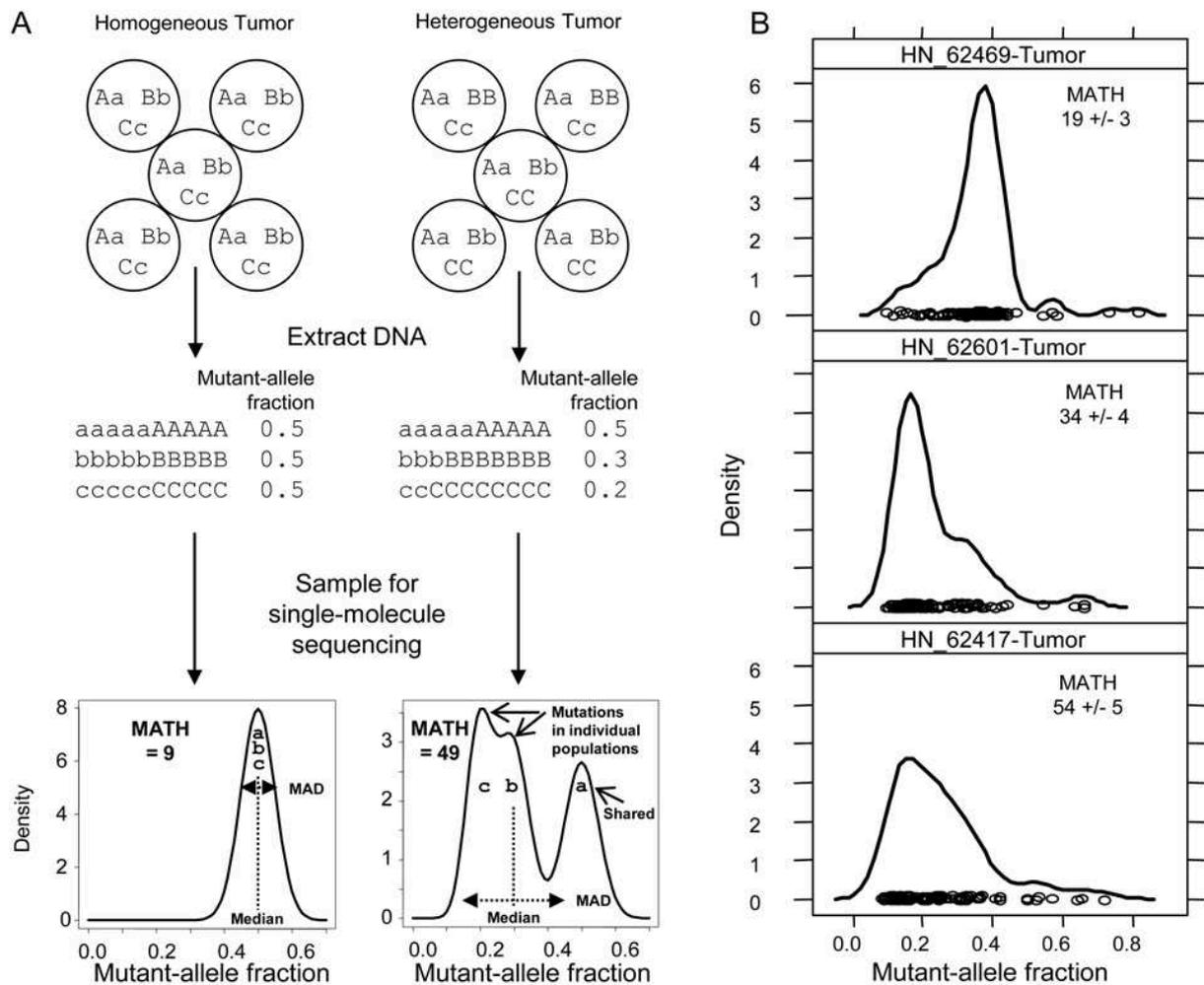


Figure 1.4-2 Mesure de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale par analyse de dispersion des fréquences alléliques (MATH).

(A) Haut : population homogène (gauche) ou hétérogène (droite) pour des mutations hétérozygotes diploïdes. Milieu : les VAF sont égales à 0.5 pour une tumeur homogène et inférieures à 0.5 pour des mutations sous-clonales dans une tumeur hétérogène. Bas : graphes des densités de Kernel. Comparativement à une tumeur homogène (gauche), la dispersion des VAF d'une tumeur hétérogène (droite) est plus grande et la valeur médiane plus petite. (B) Graphes des densités de Kernel rapportés pour trois CETC de la cohorte (haut en bas : 98, 102 et 96 loci). La MATH est rendue avec son écart-type calculé par la méthode *bootstrap*. Figure adaptée de Mroz *et al.*²¹⁴

L'association entre une valeur élevée de MATH et une réduction de la survie globale a été montrée en analyse multivariée ajustée sur des variables pronostiques usuelles (statut HPV, mutation *TP53*, engainement péri-nerveux, stade tumoral et âge)²¹⁸. Ces résultats ont pu être

vérifiés dans une large cohorte multi-institutionnelle^{219,220}. L'estimation de la MATH postopératoire permettait de stratifier le risque de décès au-delà des facteurs de risque conventionnels clinicopathologiques suggérant une utilité clinique pour guider l'intensité du traitement adjuvant²²¹. La valeur pronostique du biomarqueur associé au statut HPV et à l'expression ER α (mesurée à partir de l'ARN d'*ESR1*) a pu être évaluée dans des CETC localisés et a montré une association significative à la survie globale²²².

En définitive, la MATH est une mesure élémentaire et robuste de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale facilement transposable en clinique et d'intérêt pronostique. Les études résumées dans le Tableau 1.4-1 mettent en évidence la valeur pronostique péjorative de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale dans les CETC comme cela a pu être montré dans d'autres localisations^{223,224}. Jusqu'à présent, la MATH a été testée sur des cohortes rétrospectives et hétérogènes. Son utilité clinique reste à démontrer dans le cadre d'essais interventionnels.

Tableau 1-1 Études sur l'hétérogénéité génétique des CETC par estimation de la MATH.

NGS	Inférence HIT	Effectif	Contexte clinique	Conclusion(s)	Auteur
WES (150x)	MATH	$n = 74^{\ddagger}$	Tumeurs primitives et récurrentes	Association MATH avec : Mutation <i>TP53</i> Statut HPV Tabagisme	Mroz <i>et al.</i> ¹⁸⁰
WES (150x)	MATH	$n = 74^{\ddagger}$	Tumeurs primitives et récurrentes	Association négative survie	Mroz <i>et al.</i> ²¹⁸
WES (95x)	MATH	$n = 305^{\S}$	Tumeurs primitives opérées	Association négative survie	Mroz <i>et al.</i> ²¹⁹
WES (95x)	MATH	$n = 389^{\S}$	Tumeurs primitives opérées RT adjuvante RCT adjuvante Pas d'adjuvant	Stratification risque post-op Suggère une utilité clinique	Mroz <i>et al.</i> ²²¹
WES (95x)	MATH	$n = 156^{\S}$	Tumeurs primitives RCT exclusive RCT adjuvante	Biomarqueur composite MATH/ER α /HPV	Patel <i>et al.</i> ²²²

NGS, *Next Generation Sequencing* ; WES, *Whole-Exome Sequencing* ; HIT, Hétérogénéité intra-tumorale ; MATH, *Mutant-Allele Tumor Heterogeneity* ; RT, Radiothérapie ; RCT, (chimio)radiothérapie ; ^{\ddagger}Cohorte de Stransky *et al.*¹⁸⁰ ; ^{\S}Cohorte du TCGA¹⁷⁸.

1.4.4 Hétérogénéité génétique estimée par déconvolution clonale

Au-delà d'une estimation indirecte et quantitative de l'hétérogénéité génétique basée sur la MATH, son importance et ses déterminants au niveau clonal ont pu être évalués par des méthodes de reconstruction phylogénétique à partir des tumeurs primitives et des métastases ganglionnaires et/ou viscérales appariées.

Les études disponibles sont majoritairement représentées par des cohortes de petites tailles (moins de 20 patients) rétrospectives et hétérogènes privilégiant le recrutement de tumeurs de la cavité orale et les approches de *bulk sequencing* (Tableau 1.4-2). Les approches de séquençage sur cellules individuelles devraient permettre d'appréhender à un niveau de précision supérieur les trajectoires évolutives de ces tumeurs comme cela a été rapporté dans le cancer colorectal²²⁵.

Tableau 1-2 Études sur l'hétérogénéité génétique des CETC par déconvolution clonale.

NGS	Inférence HIT	Effectif	Sous-type(s)	Conclusions	Auteur
Séquençage d'une seule biopsie					
WES (202x)	Déconvolution clonale* Analyse des ganglions Analyse des récidives	$n = 18$	Cavité orale Larynx Pharynx	Ganglions synchrones moins divergents que les récidives métachrones Mutations <i>de novo</i> dans les ganglions	Hedberg <i>et al.</i> ²²⁶
NGS ciblé (152x)	Clonale dominant Analyse des métastases	$n = 19$	Cavité orale Larynx Pharynx CUP	Trajectoires pronostiques Embranchements Équilibre ponctué	Melhardt <i>et al.</i> ²²⁷
WES (200x)	Déconvolution clonale Inférence phylogénétique Analyse des ganglions	$n = 18$	Oropharynx	Origine multiclonale des ganglions	Sim <i>et al.</i> ²²⁸
Approche de séquençage multirégionale					
WES (44.7x)	Distance génétique [†] Chronologie clonale Analyse des ganglions	$n = 1$	Oropharynx	Embranchements Acquisition tardive du potentiel métastatique Faible divergence génétique entre la tumeur et les ganglions	Zhang <i>et al.</i> ¹¹⁸
WES (100x)	Déconvolution clonale Inférence phylogénétique [¶] Analyse des ganglions	$n = 10$	Cavité orale	Embranchements Progression parallèle des métastases Modèle linéaire	Wang <i>et al.</i> ²²⁹
WES (95x)	Interprétation visuelle [§] Analyse des ganglions	$n = 5$	Cavité orale	ITH faible (1-3 clones) Progression parallèle des métastases	Tabatabaieifar <i>et al.</i> ²³⁰
Approche de séquençage sur cellules individuelles					
RNAseq (6000 cellules)	Clustering compartiment tumoral/stromal Analyse des ganglions	$n = 18$	Cavité orale	Hétérogénéité des programmes cellulaires récapitulée par les métastases Programme p-EMT régulé par le stroma	Puram <i>et al.</i> ²³¹
RNAseq (24876 cellules)	Analyse spatiale transcriptomique	$n = 12$	Cavité orale	Profils d'expression régionaux États cellulaires spatialement déterminés	Arora <i>et al.</i> ²³²

NGS, *Next Generation Sequencing* ; WES, *Whole-Exome Sequencing* ; RNAseq, *RNA Sequencing* ; HIT, Hétérogénéité intra-tumorale ; CUP, *Carcinoma of Unknown Primary Origin* ; *La déconvolution clonale a utilisé l'algorithme bioinformatique PyClone ;
[†]L'inférence phylogénétique a utilisé la méthode des plus proches voisins²³³ ; [¶]L'inférence

phylogénétique a utilisé la méthode du maximum de parcimonie ; §L'interprétation visuelle a été confirmée secondairement *in silico*²³⁴.

1.4.4.1 Séquençage d'une seule biopsie

L'évolution clonale qui opère à progression dans les CETC a été étudiée dans une cohorte de 19 tumeurs initialement localisées et opérées à visée curative²²⁶. Les données de séquençage *whole-exome* d'une seule biopsie ont été utilisées pour comparer les tumeurs primitives aux métastases ganglionnaires synchrones ($n = 11$) et aux récidives métachrones ($n = 8$). Une hétérogénéité génétique a pu être montrée entre les tumeurs primitives et les récidives métachrones (80% de mutations communes et 40% de mutations présentes uniquement dans les récidives métachrones). Cette hétérogénéité était moins importante entre les tumeurs primitives et les métastases ganglionnaires synchrones (84.8% de mutations communes et 13.9% de mutations présentes exclusivement dans les métastases synchrones, Figure 1.4-3A).

Un clustering mutationnel a été réalisé en utilisant l'algorithme PyClone (Figure 1.4-3B-C)¹⁰⁴. Quatre-vingt pour cent des mutations présentes dans les métastases ganglionnaires synchrones étaient clonales dans la tumeur primitive à l'exception du patient PY-16 pour lequel 44% des mutations pouvaient être reliées à des clones privés de la métastase ganglionnaire (clusters 4 et 5, Figure 1.4-3B). Pour deux patients (PY-16 et PY-21), des mutations privées dans *C17orf104* et *ITPR3* étaient exclusivement présentes dans les métastases ganglionnaires suggérant leur rôle *driver* dans le processus métastatique.

Quatre-vingt-dix pour cent des mutations présentes dans les récidives métachrones étaient clonales dans la tumeur primitive (patients PY-1, PY-5 et PY-11). Un second primitif essaillant dans la récidive métachrone du patient PY-8 a finalement été identifié (cluster 2, Figure 1.4-3C).

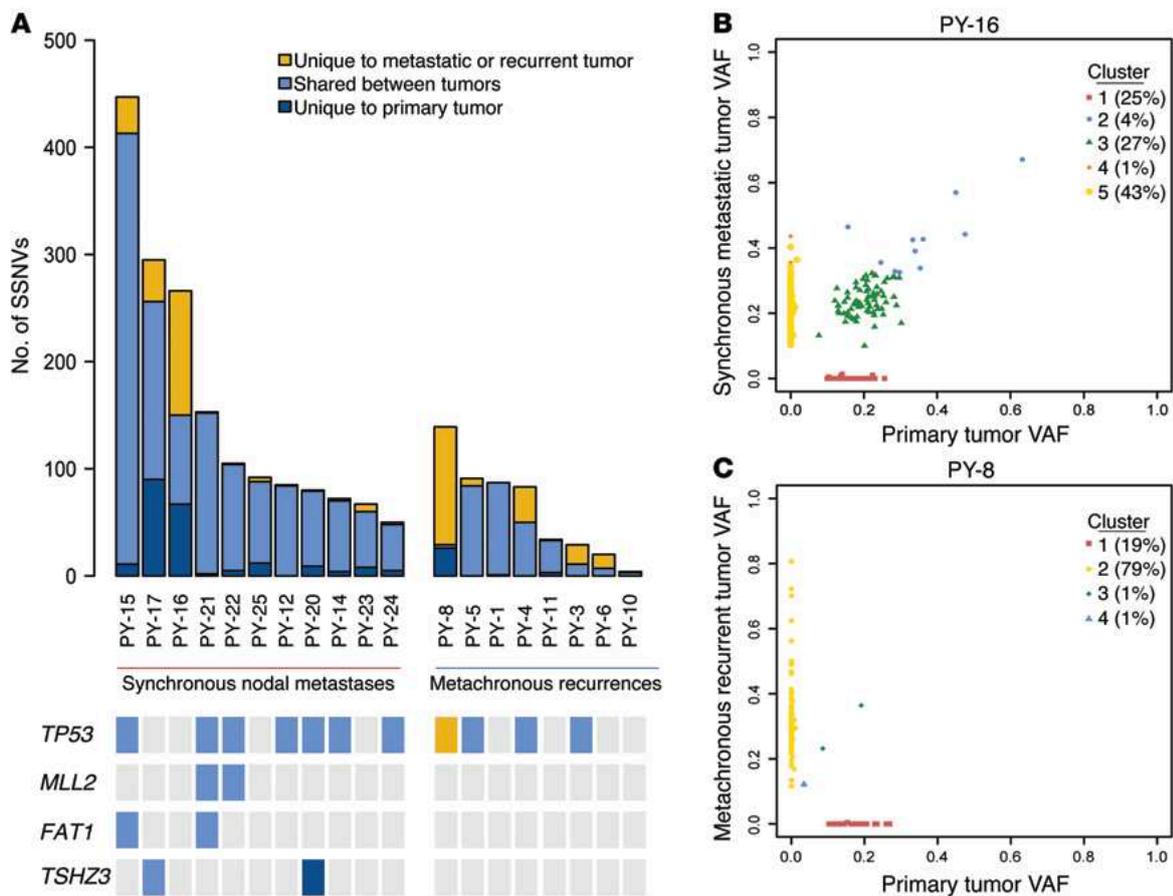


Figure 1.4-3 Hétérogénéité génétique à progression dans les cancers tête et cou par l'étude comparée des tumeurs primitives et des métastases.

(A) Comparaison des données de séquençage *whole-exome* (une seule biopsie) des tumeurs primitives, des métastases ganglionnaires synchrones ($n = 11$) et des récurrences métachrones appariées ($n = 8$). Les concordances mutationnelles parmi quatre gènes *driver* sont montrées. (B) Diagramme des clusters mutationnels présents dans la tumeur primitive et sa métastase ganglionnaire synchrone (patient PY-16). (C) Diagramme des clusters mutationnels présents dans la tumeur primitive et une métastase ganglionnaire métachrone (patient PY-8). L'interprétation révèle que la métastase est essaimée par un second tumeur primitif (cluster 1). D'après Hedberg *et al.*²²⁶

L'évolution clonale qui opère à progression a pu être décrite chez 19 patients en caractérisant la perte ou le maintien d'un clone dominant entre une tumeur primitive et ses métastases synchrones ou métachrones²²⁷. Un clone dominant était défini par une VAF (corrigée par la cellularité tumorale) $\geq 25\%$. Six patients (32%) ont perdu un clone dominant à progression indiquant un embranchement évolutif (Figure 1.4-4). Pour 13 patients (68%), la composition

clonale était stable (sans gain ni perte d'un clone dominant) indiquant un équilibre ponctué. Une évolution ramifiée était associée à un délai plus court jusqu'à progression métastatique et une survie globale moins bonne en comparaison de l'équilibre ponctué.

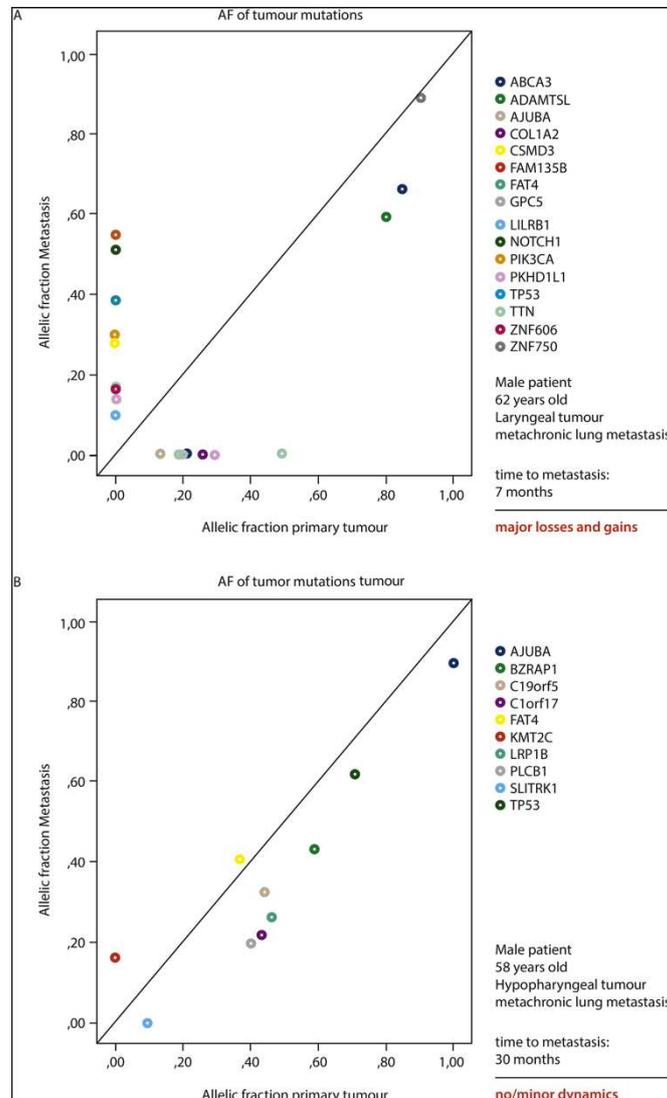


Figure 1.4-4 Evolution ramifiée et équilibre ponctué au cours de l'évolution métastatique dans les cancers tête et cou.

(A) Évolution ramifiée chez un patient rapidement progressif (délais jusqu'à métastase de 7 mois). Le clone dominant (VAF $\geq 25\%$) est perdu durant le processus métastatique. Des mutations *de novo* sont identifiées dans la métastase. (B) Équilibre ponctué chez un patient lentement évolutif (délais jusqu'à métastase de 30 mois). La composition clonale est stable au cours du processus métastatique indiqué par la distribution des VAF autour de la diagonale. D'après Melchardt *et al.*²²⁷

Une étude a rapporté récemment les résultats d'un séquençage *whole-exome* de 18 tumeurs de l'oropharynx (majoritairement liées à HPV) et de 40 ganglions métastatiques (1 à 3 ganglion[s] par patient). L'hétérogénéité génétique qui existe entre la tumeur primitive et les métastases ganglionnaires était liée aux mutations *de novo* de gènes de la voie Wnt identifiées dans les ganglions en ruptures capsulaires²²⁸. Les clones identifiés dans les ganglions pouvaient provenir aussi bien des relais ganglionnaires que de la tumeur primitive.

1.4.4.2 Approche de séquençage multirégional

La faisabilité d'une approche de séquençage multirégional du génome a été montrée chez un patient suivi pour un carcinome épidermoïde de l'oropharynx lié à HPV¹¹⁸. Cinq prélèvements tissulaires éloignés géographiquement (incluant trois biopsies de la tumeur primitive et deux biopsies d'une métastase ganglionnaire synchrone) ont été séquencés en *whole-exome*. Des *distances génétiques* ont pu être calculées entre les régions tumorales et matérialisées par un arbre phylogénétique²³³. La chronologie des événements clonaux a également été reconstituée à partir des CCF des mutations²³⁵. Les régions tumorales les plus proches géographiquement appartenaient à une même branche. Les sous-clones métastatiques descendaient d'un même clone ancestral d'apparition tardive dans l'histoire naturelle (Figure 1.4-5).

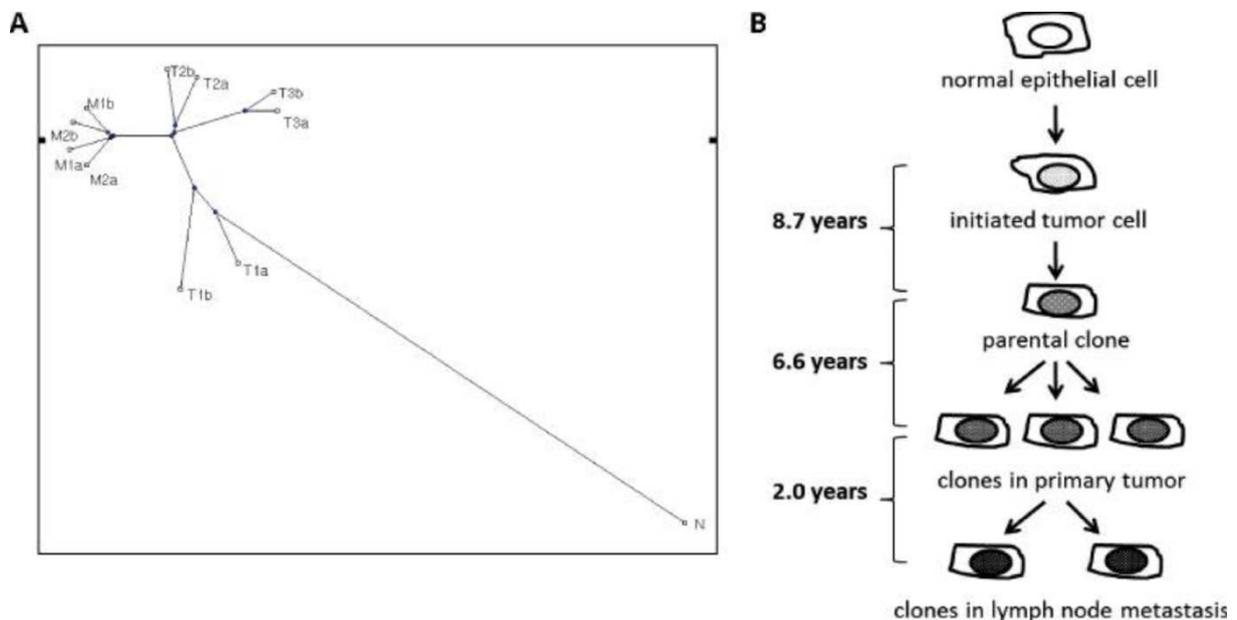


Figure 1.4-5 Inférence phylogénétique et chronologie des événements clonaux par séquençage multirégional d'une tumeur de l'oropharynx.

(A) L'arbre phylogénétique a été construit en calculant des *distances génétiques* entre les régions éloignées géographiquement de la tumeur primitive (T), des métastases (M) et à partir du sang circulant (N). (B) Chronologie des événements clonaux basée sur l'estimation des CCF. D'après Zhang *et al.*¹¹⁸

Le séquençage *whole-exome* multirégional de dix tumeurs primitives de la cavité orale non prétraitées (35 régions tumorales et 7 ganglions métastatiques) a montré que 61% des mutations étaient hétérogènes entre les régions²²⁹. Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant les CCF de toutes les mutations somatiques identifiées (incluant 1 720 mutations non silencieuses et 433 mutations silencieuses réparties entre 1 287 gènes, Figure 1.4-6).

Les auteurs ont pu identifier des événements moléculaires ancestraux incluant des mutations de *TP53*, *NOTCH1*, *CREBP* et *KMT2D* et des amplifications de 11q13 (emportant *HER4*, *COTL1* et *TRAPPC8*). Des événements moléculaires d'apparition plus tardive incluaient des mutations de *MTOR*, *KEAP1* et *FAM135B* ainsi que des amplifications de 7p11.2 (emportant *NOTCH1*) et des délétions de 9p21.3 (emportant *CASP8*). Le tronc était enrichi significativement en événements *driver* d'apparition précoce au cours de l'évolution en comparaison des événements identifiés dans les branches²³⁶. Des mutations convergentes ont pu être identifiées chez deux patients (mutations *hotspots* de *SCEL* chez le patient OSCC10 et mutations *hotspots* de *NFE2L2* chez le patient OSCC02) suggérant des contraintes évolutives.

L'analyse comparée des tumeurs primitives et des ganglions métastatiques chez trois patients a révélé que plusieurs trajectoires évolutives étaient possibles au cours de l'évolution métastatique^{5,236}. Une progression parallèle (indiquant une dissémination précoce des métastases) définie par une hétérogénéité des tumeurs primitives et des ganglions a été rapportée chez deux patients (OSCC08 et OSCC10). Ce modèle a été décrit dans le cancer du pancréas²³⁷, le cancer du sein³⁸, le mélanome uvéal²³⁸ et certains cRCC (profil *multiclonal driver*)²³⁹. Un modèle linéaire où les métastases dérivent d'un clone qui apparaît tardivement dans la tumeur primitive a été rapporté chez un patient (OSCC02). Ce modèle a été décrit dans les cancers du sein²⁴⁰ et de la prostate²⁴¹.

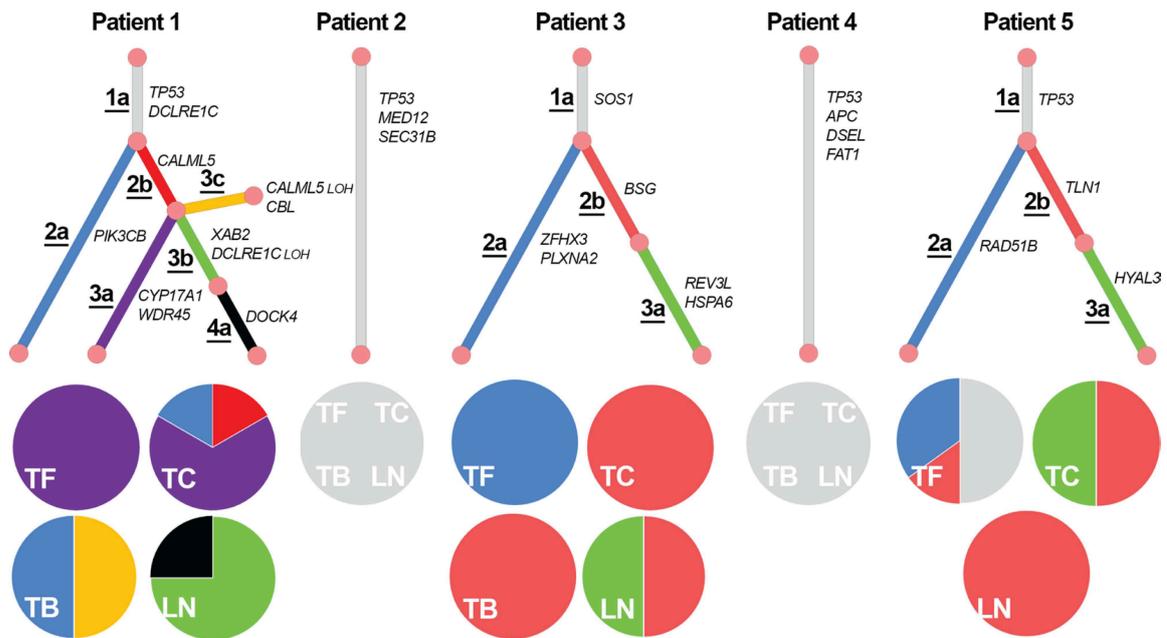


Figure 1.4-7 Inférence phylogénétique par séquençage multirégional de cinq tumeurs primitives de la cavité orale.

Les arbres sont construits manuellement en utilisant les BAF, les mutations et les CNV. Les *pie charts* représentent les biopsies dans différentes régions tumorales (TC, biopsie centrale ; TF, biopsie antérieure ; TB, biopsie postérieure ; LN, biopsie ganglionnaire) et leur composition clonale. Les patients 2, 4 et 5 étaient dépourvus de clones privés dans les métastases. Les patients 1, 3 et 5 sont des exemples de progression parallèle des métastases et des tumeurs primitives. D'après Tabatabaeifar *et al.*²³⁰

1.4.4.3 Approche de séquençage sur cellules individuelles

Plusieurs études de séquençage sur cellules individuelles sont disponibles dans les CETC capturant l'hétérogénéité génétique intra-tumorale et ses conséquences fonctionnelles à un niveau de résolution cellulaire et s'affranchissant des limites imposées par les approches de *bulk sequencing*^{242,243}.

Nous rapportons les résultats d'une première étude sur 18 carcinomes épidermoïdes de la cavité orale non prétraités (incluant cinq ganglions métastatiques appariés) et pour lesquels les profils d'expression ARN établis sur ~6000 cellules (incluant 2215 cellules malignes et 3363 cellules du micro-environnement tumoral) étaient disponibles²³¹. L'analyse du compartiment tumoral a montré une expression différentielle de programmes du cycle cellulaire, de l'hypoxie, du stress et de la différenciation épithéliale. Une sous-population de cellules exprimait un programme

partiel de transition épithélio-mésenchymateuse (p-EMT) se limitant à l'expression de protéines de la matrice extracellulaire. En comparant les sites primitifs aux métastases ganglionnaires, les auteurs ont montré que l'hétérogénéité du compartiment tumoral était récapitulée par les métastases. Une lecture spatiale a également révélé que les cellules métastatiques exprimant le programme p-EMT étaient circonscrites au front d'invasion de la tumeur au contact de fibroblastes exprimant TGF β . Cette observation suggérait que la compétence métastatique pouvait être médiée par les cellules du stroma tumoral. Les cellules tumorales exprimant un programme de différenciation épithéliale étaient plutôt circonscrites au centre de la tumeur. Les auteurs ont pu proposer un modèle de progression métastatique impliquant la migration de clusters de cellules tumorales et stromales plutôt que de cellules malignes individuelles.

Plus récemment, une analyse transcriptomique spatiale sur 12 carcinomes épidermoïdes de la cavité orale (analysant simultanément la topographie des cellules dans un espace repéré à deux dimensions) a confirmé l'existence d'un front d'invasion et d'un centre tumoral architecturalement et fonctionnellement polarisés²³². Les cellules qui composent ces régions sont caractérisées par des profils d'expression et des interactions ligands-récepteurs uniques reliés à différents états cellulaires spatialement déterminés. Dans ce modèle, l'hétérogénéité intra-tumorale semble plutôt gouvernée par une différenciation hiérarchique des cellules (plutôt qu'une évolution clonale) durant laquelle des cellules progénitrices opèrent une transition vers un phénotype motile et invasif par l'acquisition graduelle d'un phénotype épithélio-mésenchymateux.

2 Deuxième partie

2.1 Contexte général de la thèse de sciences

Les CETC sont la septième cause de cancer dans le monde¹⁶⁶. En situation de récurrence et/ou métastatique, le pronostic des patients est sombre avec une médiane de survie d'une année en l'absence de traitement^{188,189}. Traditionnellement diagnostiqués chez des patients âgés éthylo-tabagiques, ces cancers liés à une exogénose connaissent un déclin en partie dû à la diminution de la consommation de tabac^{167,168}. Inversement, les cancers de l'oropharynx liés aux HPV oncogènes (16 et 18 principalement) sont en augmentation dans les populations occidentales^{168,169}. Bien que les cancers viro-induits se présentent souvent au diagnostic à un stade clinique avancé, leur pronostic est plutôt favorable en comparaison des CETC non viro-induits^{172,173}.

Le cetuximab, un anticorps monoclonal ciblant l'EGFR, est la seule thérapie ciblée approuvée en association à la radiothérapie dans les CETC localement avancés¹⁹⁸ et en association aux platines dans les CETC récurrents et/ou métastatiques¹⁹⁹. L'efficacité du cetuximab en monothérapie est marginale en l'absence de toute présélection moléculaire²⁰⁰. Bien que de nombreux efforts aient été déployés pour la recherche et la priorisation de biomarqueurs^{182,244-250}, aucun n'est disponible en routine clinique en dehors des essais *plateformes* guidés par la génomique²⁵¹. Finalement, la stratégie thérapeutique prend uniquement en compte la localisation anatomique et le stade de la maladie à défaut d'intégrer dans les algorithmes de prise en charge son étiologie sous-jacente (une exogénose ou une infection par un HPV à haut risque) et ses caractéristiques moléculaires^{183,186,187}.

Les cellules malignes au sein d'une même tumeur se caractérisent par une diversité morphologique et une variabilité d'expression de marqueurs génétiques à l'origine d'une hétérogénéité génétique intra-tumorale⁵. Le processus continu de mutation et de sélection donne naissance à des populations génétiquement distinctes (encore appelées *clones cellulaires*), chacune avec sa propre distribution topographique à l'origine d'une hétérogénéité spatiale. L'architecture clonale varie dans le temps et entre une tumeur primitive et sa métastase^{7,239,252}. Elle est façonnée par un équilibre dynamique entre les sous-clones, l'environnement tissulaire, la pression de sélection thérapeutique et la sélection naturelle à l'origine d'une hétérogénéité temporelle. Il est bien établi que plus une tumeur est hétérogène, plus le pronostic est sombre^{29,39,223,224}. L'hétérogénéité intra-tumorale peut être perçue comme un réservoir de

diversité génétique pour lequel les chances de voir émerger un sous-clone avec une compétence métastatique ou résistant aux traitements augmentent au cours de l'évolution^{52,253,254}.

Les études disponibles dans les CETC s'accordent sur l'omniprésence d'une hétérogénéité génétique intra-tumorale dont l'importance semble corrélée à une diminution de la survie globale^{214,218,219,222} et à une augmentation du risque de progression métastatique²²⁷. Les modèles privilégient des évolutions ramifiées des sous-clones plutôt qu'une évolution linéaire avec une même cellule accumulant successivement des événements oncogéniques^{229,230,255}. L'analyse comparée des génomes des tumeurs primitives et des métastases conforte l'idée d'une dissémination précoce suivie d'une accumulation en parallèle de nouvelles mutations dans la tumeur primitive et absentes des métastases^{229,230}.

La plupart des études sur l'hétérogénéité des CETC reposent sur le séquençage en masse d'une seule biopsie qui sous-estime la part d'hétérogénéité spatiale et temporelle d'une tumeur et limitent les possibilités d'inférence clonale^{214,226-228}. D'un autre côté, les études de séquençage multirégional ou sur cellules individuelles privilégient les tumeurs de la cavité orale²²⁹⁻²³² limitant l'extrapolation des résultats aux autres localisations anatomiques.

L'analyse de l'ADN plasmatique d'origine tumorale obtenu par biopsie liquide permet de caractériser plus facilement et itérativement les altérations moléculaires présentes dans l'ensemble de la tumeur primitive et ses métastases ainsi que leurs évolutions au cours du temps^{256,257}. Plusieurs études ont montré la faisabilité d'un séquençage ciblé du ctDNA dans les CETC localisés et métastatiques révélant une hétérogénéité spatiale et une émergence de variants à progression et sous traitement²⁵⁸⁻²⁶¹.

2.2 Hypothèses et objectifs

L'hétérogénéité génétique intra-tumorale des CETC associée à une faible prévalence de mutations actionnables limitent la détection de nouveaux biomarqueurs et le déploiement d'une médecine de précision^{180-182,262,263}. Nous faisons l'hypothèse qu'une meilleure compréhension des processus évolutifs et des déterminants génétiques impliqués dans l'hétérogénéité intra-tumorale spatiale et temporelle devrait permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs d'intérêt pronostique et théranostique.

Les objectifs de ma thèse de sciences étaient les suivants :

1. Caractériser une hétérogénéité génétique intra-tumorale par le séquençage multirégional du génome et du transcriptome de CETC localisés guidé par l'annotation spatiale des régions histologiquement peu et bien différenciées ;
2. Caractériser une hétérogénéité intra-tumorale temporelle :
 - a) Par l'analyse comparée des génomes de CETC opérés à visée curative, des maladies résiduelles minimales et des récurrences à distance représentées par l'ADN tumoral circulant ;
 - b) Par des analyses multiomiques de biopsies tissulaires avant et après exposition à une thérapie ciblée pour la recherche de biomarqueurs pharmacodynamiques ;
3. Estimer la valeur pronostique :
 - a) De l'hétérogénéité intra-tumorale spatiale dans des CETC localisés ;
 - b) D'une maladie résiduelle minimale basée sur la détection de l'ADN tumoral circulant dans des CETC opérés.

3 Troisième partie

3.1 Résultats sur l'hétérogénéité intra-tumorale spatiale

3.1.1 Introduction

Les cellules cancéreuses au sein d'une même tumeur se caractérisent par une diversité morphologique et une variabilité d'expression de marqueurs moléculaires⁵. Le processus continu de mutations et de sélection donne naissance à des populations génétiquement distinctes, chacune avec sa propre distribution topographique à l'origine d'une hétérogénéité spatiale⁷.

La composition clonale et l'hétérogénéité génétique des CETC sont à ce jour peu caractérisées. Les études sont majoritairement basées sur le séquençage de prélèvements tumoraux uniques qui sous-estiment la part d'hétérogénéité spatiale et temporelle d'une tumeur et limitent les possibilités d'inférence clonale^{214,226-228}. D'un autre côté, les études basées sur le séquençage de prélèvements tumoraux multirégionaux ou de cellules individuelles privilégient des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale²²⁹⁻²³² limitant l'extrapolation des résultats aux autres localisations anatomiques. Par exemple, la propension des tumeurs de la cavité orale à métastaser en dehors des ganglions est plus faible comparativement aux CETC développés aux dépens de l'oropharynx ou du larynx (6% vs 16%, respectivement) suggérant des déterminants oncogéniques de l'évolution différents²⁶⁴.

Une autre limitation de ces études principalement basées sur des techniques de séquençage *whole-exome* réside dans la faible profondeur de séquençage et le manque de sensibilité pour la détection des sous-clones tumoraux minoritaires.

Les premiers travaux réalisés dans le cadre de ma thèse de sciences ont consisté à caractériser l'hétérogénéité intra-tumorale spatiale de CETC localisés et opérés dans SCANDARE (NCT03017573). Les objectifs étaient les suivants :

- Caractériser et quantifier une hétérogénéité histologique spatiale et en préciser sa valeur pronostique ;
- Valider la faisabilité d'un séquençage multirégional du génome et du transcriptome guidé par l'annotation spatiale des régions tumorales histologiquement peu et bien différenciées ;

- Caractériser une hétérogénéité génomique et transcriptomique intra-tumorale, en préciser les impacts en termes de médecine de précision, la valeur pronostique et les voies de signalisation cellulaires impliquées ;
- Caractériser une hétérogénéité du micro-environnement tumoral ;
- Inférer la composition clonale des CETC à partir des données de séquençage du génome et identifier des trajectoires évolutives redondantes et pronostiques en exploitant des modèles d'arbres phylogénétiques.

J'ai pu collaborer à l'annotation spatiale des régions tumorales en microscopie optique, à la caractérisation du microenvironnement tumoral (infiltrat lymphocytaire et expression de PD-L1), à la mise au point d'un score d'hétérogénéité pathologique intra-tumorale et à l'interprétation des variants pathogènes. Ma contribution a également consisté à implémenter et à consolider la base de données cliniques incluant une actualisation des données de survie. Ces travaux sont encore à un stade préliminaire pour les deux derniers objectifs. Après avoir présenté l'étude SCANDARE et les méthodes utilisées pour répondre aux objectifs, je détaillerai les principaux résultats obtenus jusqu'à présent.

3.1.2 Étude SCANDARE

Les prélèvements tissulaires ont été réalisés chez des patients avec un diagnostic de CETC localisé et primo-traités par chirurgie à visée curative à l'Institut Curie (Paris et Saint-Cloud, France) entre le 05/01/2017 et le 04/07/2019 dans le cadre de l'étude institutionnelle SCANDARE (investigateur principal : Professeur Christophe Le Tourneau). Les patients ont tous été inclus après signature du formulaire de consentement. Les autorisations réglementaires ont été obtenues en juillet 2016 pour l'autorisation de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) et en décembre 2016 pour l'avis du Comité de Protection des Personnes (CPP Ile de France III).

SCANDARE est une étude prospective de *biobanking* (tissulaire, plasmatique et sanguin) dont l'objectif principal est d'évaluer les liens entre les altérations moléculaires au niveau tumoral, le micro-environnement et la réponse immunitaire. Cette étude destinée à promouvoir la recherche translationnelle ne formule aucune hypothèse *a priori*. L'étude est ouverte aux cancers de l'ovaire et aux cancers du sein triple négatifs éligibles à une chirurgie première à visée curative ou à une chimiothérapie néoadjuvante, aux CETC éligibles à une chirurgie

première à visée curative et aux cancers du col de l'utérus non prétraités avec une indication de (chimio)radiothérapie.

Initialement, 100 patients ont été inclus dans la cohorte CETC (fermeture des inclusions en juillet 2019). Un amendement approuvé par le CPP et l'ANSM a autorisé la réouverture de la cohorte en novembre 2020 pour augmenter le nombre d'inclusions à 200 patients (fermeture des inclusions prévue en janvier 2024). La période de suivi dans l'étude est de 3 ans. Les patients sont traités dans SCANDARE conformément aux recommandations des sociétés savantes.

Pour la cohorte CETC, des prélèvements tissulaires réalisés pendant la chirurgie première à visée curative et au moment de la récurrence avant traitement sont inclus en paraffine et fraîchement congelés. Des prélèvements sanguins réalisés sur tubes EDTA et tubes secs sont également collectés pendant puis après la chirurgie (à la première consultation postopératoire) et à progression (avant le premier cycle de traitement systémique si indiqué). En l'absence de récurrence précoce, les prélèvements sanguins sont collectés six mois après la chirurgie puis à progression. Dans le cadre de ce travail de thèse sur l'hétérogénéité spatiale, seuls les prélèvements tissulaires réalisés pendant la chirurgie ont été exploités (Figure 3.1-1).

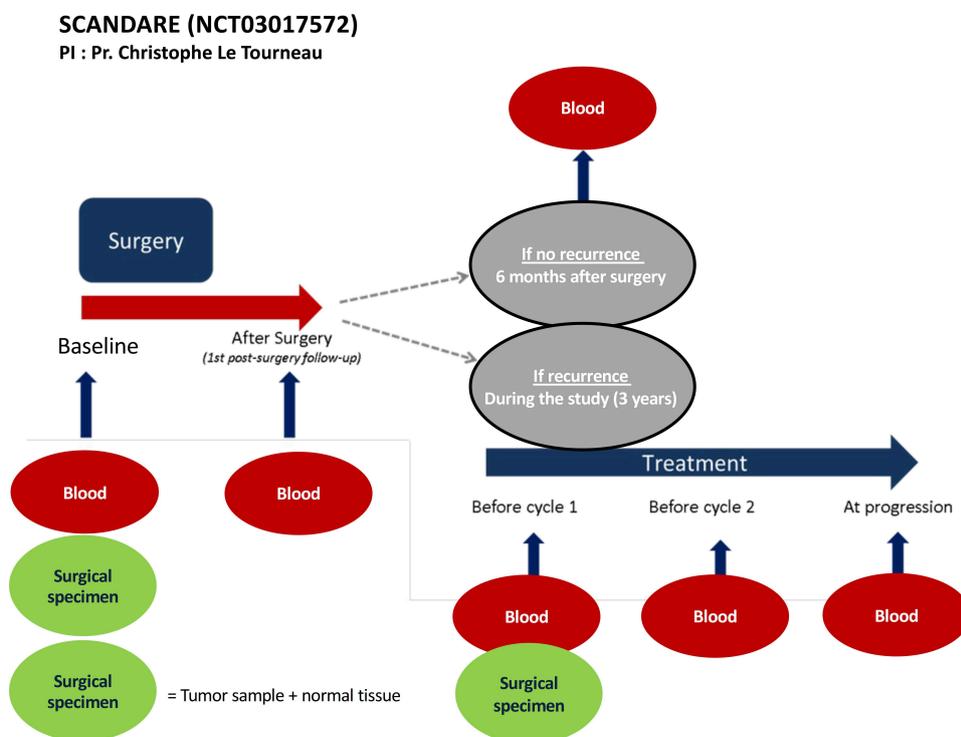


Figure 3.1-1 *Workflow* de l'étude SCANDARE pour les cancers de la tête et du cou.

3.1.3 Hétérogénéité histologique intra-tumorale

3.1.3.1 Matériel et méthodes

Pour pouvoir appréhender l'hétérogénéité histologique intra-tumorale, nous avons examiné en microscopie optique les lames colorées à l'hématéine-éosine-safran (HES) issues de blocs paraffines (FFPE, *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) recueillis à chirurgie pour 90 patients de la cohorte SCANDARE. Nous avons isolé 1 à 5 région(s) géographiquement éloignées par patient (281 régions au total) sur la base de critères histologiques de différenciation. Les lames HES ont été cerclées puis annotées selon deux modalités *bien différencié* ($n = 147$) ou *peu différencié* ($n = 134$).

Pour chacune des régions cerclées, nous avons quantifié la surface tumorale (intervalle, 2-300 mm²), l'infiltrat lymphocytaire (TILs) et le statut HPV par recherche de séquence d'ADN viral par PCR. Un immunomarquage complémentaire a été réalisé pour évaluer le niveau d'expression de PD-L1 en utilisant le clone Dako 22C3²⁶⁵. Un score CPS (*Combined Positive Score*) a été calculé de la façon suivante :

$$CPS = \frac{\text{Nombre cellules}_{PD-L1+}}{\text{Nombre de cellules tumorales viables}} \times 100 \quad (15)$$

Les cellules évaluées pour PD-L1 correspondaient aux cellules tumorales, aux lymphocytes et aux macrophages.

Nous avons finalement implémenté un score d'hétérogénéité pathologique intra-tumorale incluant quatre niveaux en utilisant la proportion relative de contingents tumoraux (définis par la surface des cerclages) bien et peu différenciés :

- Le niveau I était défini par la présence de plus de 80% de contingent tumoral bien différencié (tumeur homogène) ;
- Le niveau II était défini par la présence de plus de 80% de contingent tumoral peu différencié (tumeur homogène) ;
- Le niveau III_{low} (III-L) était défini par la présence de moins de 30% de contingent tumoral peu différencié (tumeur hétérogène) ;
- Le niveau III_{high} (III-H) était défini par la présence de plus de 30% de contingent tumoral peu différencié (tumeur hétérogène).

Des modèles de Cox pronostiques (univariés et multivariés) pour la survie sans récurrence (RFS) ont été ajustés pour le score d'hétérogénéité pathologique, les variables cliniques (incluant l'âge, le sexe, le statut éthylo-tabagique, les stades T et N de la classification AJCC et le statut HPV) et les variables histologiques (incluant le grade histologique, les TILs et le score CPS). Pour chaque patient, nous avons retenu les valeurs de TILs et les scores CPS qui correspondaient à la région avec la surface la plus grande. L'association entre le score d'hétérogénéité pathologique et les variables clinicopathologiques a également été testée.

3.1.3.2 Résultats

Au total, 88 patients ont été inclus dans l'analyse (deux patients ayant retiré leur consentement). Les caractéristiques des patients à l'inclusion sont présentées dans le Tableau 3.1-1. Les profils tumoraux étaient dominés par des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale (51%). Les tumeurs étaient majoritairement de petits stades (T1-2, 59%), négatives pour le statut HPV (74%) et plutôt infiltrées en lymphocytes (TILs \geq 10%, 83%). Une minorité des tumeurs étaient négatives pour l'expression de PD-L1 (CPS $<$ 1, 23%). Après un suivi médian de 17 mois, 37 patients (42%) ont présenté une récurrence avec une médiane de RFS de 18 mois (intervalle de confiance [IC] à 95%, 14-40 mois).

Le score d'hétérogénéité pathologique n'était pas pronostique en analyse univariée ($p = 0.9$). En analyse multivariée, le stade tumoral corrélait à une augmentation du risque de récurrence (T3-4 vs T1-2, Hazard Ratio [HR] = 2.5, $p = 0.02$). L'infiltrat lymphocytaire, quant à lui, corrélait à une réduction du risque de récurrence (TILs \geq 10% vs TILs $<$ 10%, HR = 0.2, $p = 0.01$, Figure 3.1-2). Ce dernier résultat devait toutefois être nuancé compte tenu des effectifs faibles ($n = 5$) dans la classe TILs $<$ 10%.

Nous avons identifié une plus grande proportion de tumeurs homogènes I-II chez les fumeurs en comparaison des non-fumeurs (19% vs 3%) et une plus faible proportion de tumeurs hétérogènes III-L chez les fumeurs (48% vs 65%, p ajusté = 0.05).

Tableau 3-1 Caractéristiques clinicopathologiques de 88 patients SCANDARE.

	Total (n = 88)
Sexe, n (%)	
Femme	29 (33%)
Homme	59 (67%)
Age, années	
Median	64
Range	22-83
Site primitif, n (%)	
Hypopharynx	5 (5.7%)
Larynx	9 (10%)
Cavité orale	45 (51%)
Oropharynx	29 (33%)
Consommation d'alcool, n (%)	
Non	47 (53%)
Oui	41 (47%)
Tabagisme, n (%)	
Non	40 (45%)
Oui	48 (55%)
Stade T avant chirurgie[¶], n (%)	
T1	25 (28%)
T2	27 (31%)
T3	15 (17%)
T4	21 (24%)
Stade N avant chirurgie[¶], n (%)	
N0	46 (52%)
N1	22 (25%)
N2	20 (23%)
Grade histologique, n (%)	
Bien différencié	56 (64%)
Modérément différencié	22 (25%)
Peu différencié	8 (9.1%)
Indifférencié	2 (2.3%)
Statut HPV, n (%)	
Négatif	65 (74%)
Positif	23 (26%)
TILs, n (%)	
< 10%	5 (6%)
≥ 10%	83 (94%)
CPS, n (%)	
0-0.9	20 (23%)
1-19	41 (47%)
> 20	27 (31%)

[¶]American Joint Committee on Cancer, 7th Edition staging; HPV, *Human Papillomavirus*; TILs, *Tumor Infiltrating Lymphocytes*; CPS, *Combined Positive Score*.

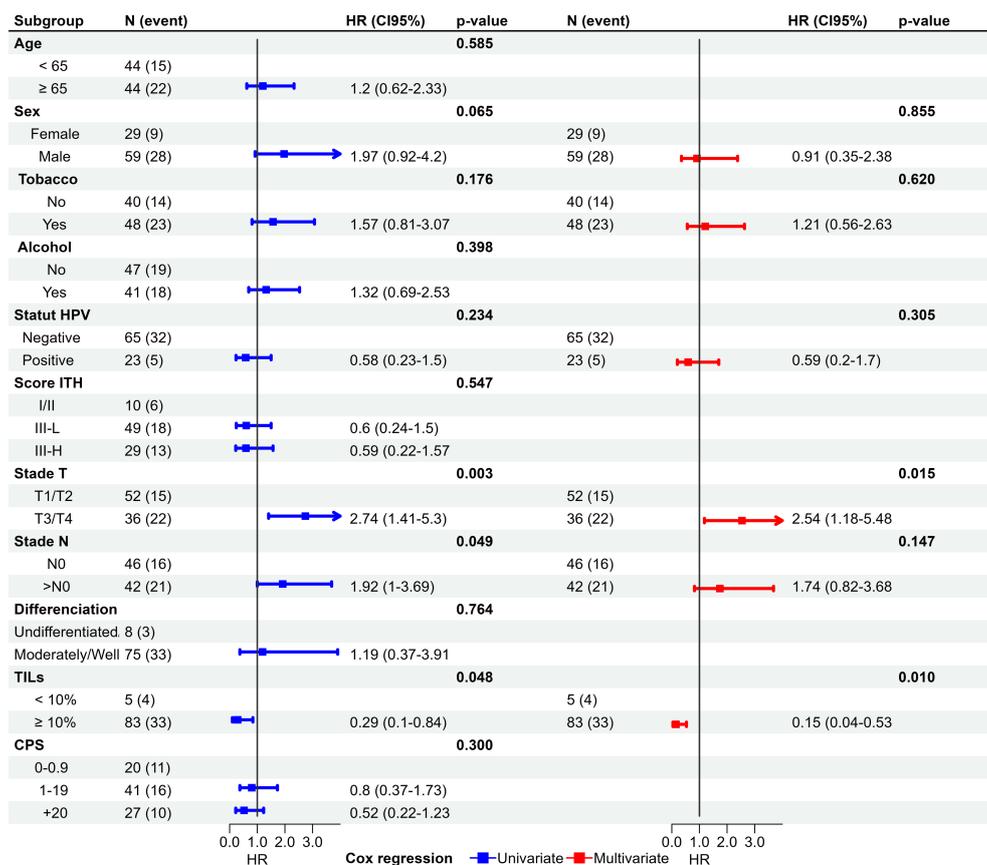


Figure 3.1-2 Diagramme en forêt des risques instantanés relatifs de récurrence chez 88 patients SCANDARE pour plusieurs variables clinicopathologiques.

Les HR et les intervalles de confiance à 95% sont estimés en utilisant des modèles de Cox univariés (bleu) ou multivariés (rouge).

3.1.4 Hétérogénéité génétique intra-tumorale

3.1.4.1 Matériel et méthodes

En tirant parti de la délimitation régionale des tumeurs par niveau de différenciation histologique, nous avons pu caractériser l'hétérogénéité génétique intra-tumorale par un séquençage multirégional du génome.

Les prélèvements tissulaires de 90 patients (280 régions tumorales au total) ont été extraits en acides nucléiques (ADN et ARN). Quarante-trois patients disposaient d'une quantité suffisante d'ADN (230 régions tumorales avec un *crossing point* < 30, Figure 3.1-3) et deux

patients ayant retiré leur consentement ont été exclus des analyses. L'identitovigilance de chaque échantillon a pu être vérifiée. Les patients ont ensuite été séquencés en NGS avec un panel ciblé *in-house* de 571 gènes d'intérêt pronostique et théranostique (panel DRAGON). Les variants pathogènes ont été filtrés en utilisant un algorithme astringent :

- Profondeur de séquençage > 100x ;
- VAF > 10% ;
- Fréquence du variant dans la population générale < 0.5% (fréquence des SNP) ;
- Absence de biais de brin (déséquilibre de représentation d'un variant sur le brin sens ou anti-sens) ;
- Variants validés dans la database OncoKB²⁶⁶ (<https://www.oncokb.org/>);
- Pour les gènes suppresseurs de tumeur, validation des mutations *perte de fonction*, des mutations tronquantes et des délétions homozygotes incluant les mutations sur les sites d'épissage en positions -1, -2, +1 et +2 ;
- Pour les oncogènes, validation des mutations *hotspots* et des amplifications focales ;
- Pour *TERT*, validation des mutations *hotspots* dans le promoteur (g.1295228, g.1295250 et g.1295501) quelles que soient la fréquence allélique et la profondeur de séquençage ;
- TMB < 40 mut/Mb.

Chaque région tumorale a pu être annotée pour la présence d'un variant et pour la présence de variants hétérogènes impliquant des VAF < 10% et des biais de brin. L'analyse intégrative des altérations moléculaires et des données clinicopathologiques était rendue sous la forme d'*oncoprints* créés sur R en utilisant les fichiers de variants somatiques standardisés MAF (*Mutation Annotation Format*) et le *package* *maftools*²⁶⁷.

Les variants pathogènes étaient priorisés par niveau d'actionnabilité en utilisant la classification pan-cancer OncoKB²⁶⁶ et la classification ESCAT dédiée aux CETC¹⁸².

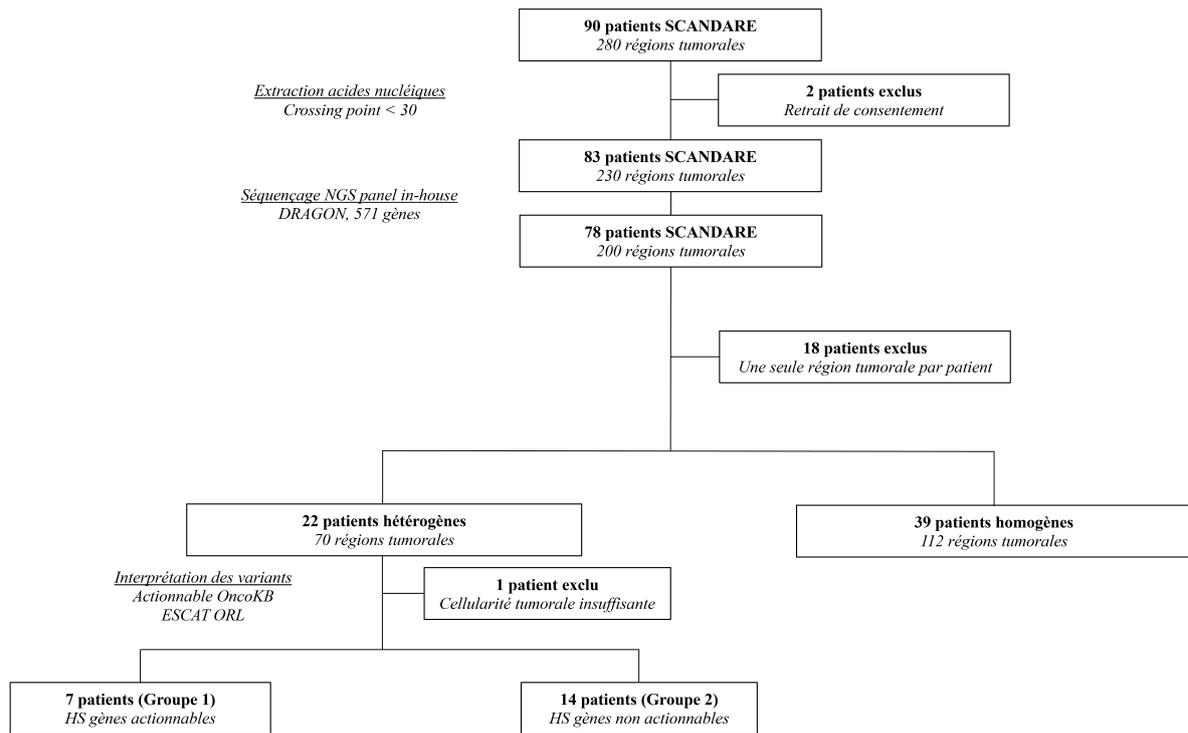


Figure 3.1-3 *Flowchart* des patients SCANDARE pour l'analyse de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale.

3.1.4.2 Résultats

Soixante-dix-huit patients séquencés pour l'ADN (200 régions tumorales au total) ont passé les contrôles qualités. Parmi eux, 18 (23%) n'avaient plus qu'un seul échantillon tumoral et n'étaient pas exploitables pour l'analyse de l'hétérogénéité génétique. Sur 60 patients avec au moins deux échantillons disponibles, 22 (37%) étaient hétérogènes pour des variants pathogènes (Figure 3.1-3).

Parmi les 22 patients hétérogènes, un patient a été exclu pour cellularité tumorale insuffisante (5%), sept (32%) étaient hétérogènes du point de vue de variants pathogènes actionnables (Groupe 1) et 14 (64%) étaient hétérogènes du point de vue de variants pathogènes non actionnables (Groupe 2, Figure 3.1-4).

En utilisant OncoKB, nous avons identifié une hétérogénéité de biomarqueurs *théranostiques* (*PIK3CA*, *EGFR* et *TSC2*, Niveau I) et *hypothétiques* (*ARID1A*, *PTEN* et *CDKN2A/B*, Niveau IV). En utilisant ESCAT, nous avons identifié une hétérogénéité de biomarqueurs *investigationnels* (*EGFR* et *CDKN2A/B*, Échelon IIA), *hypothétiques* (*PIK3CA* et *PTEN*, Échelon IIIA) et *en développement* (*TP53*, Échelon V). Nous rapportons enfin une

hétérogénéité de biomarqueurs actionnables non annotés dans les classifications OncoKB et ESCAT (*NOTCH1*, *POLE* et *KMT2C*, Figure 3.1-5).

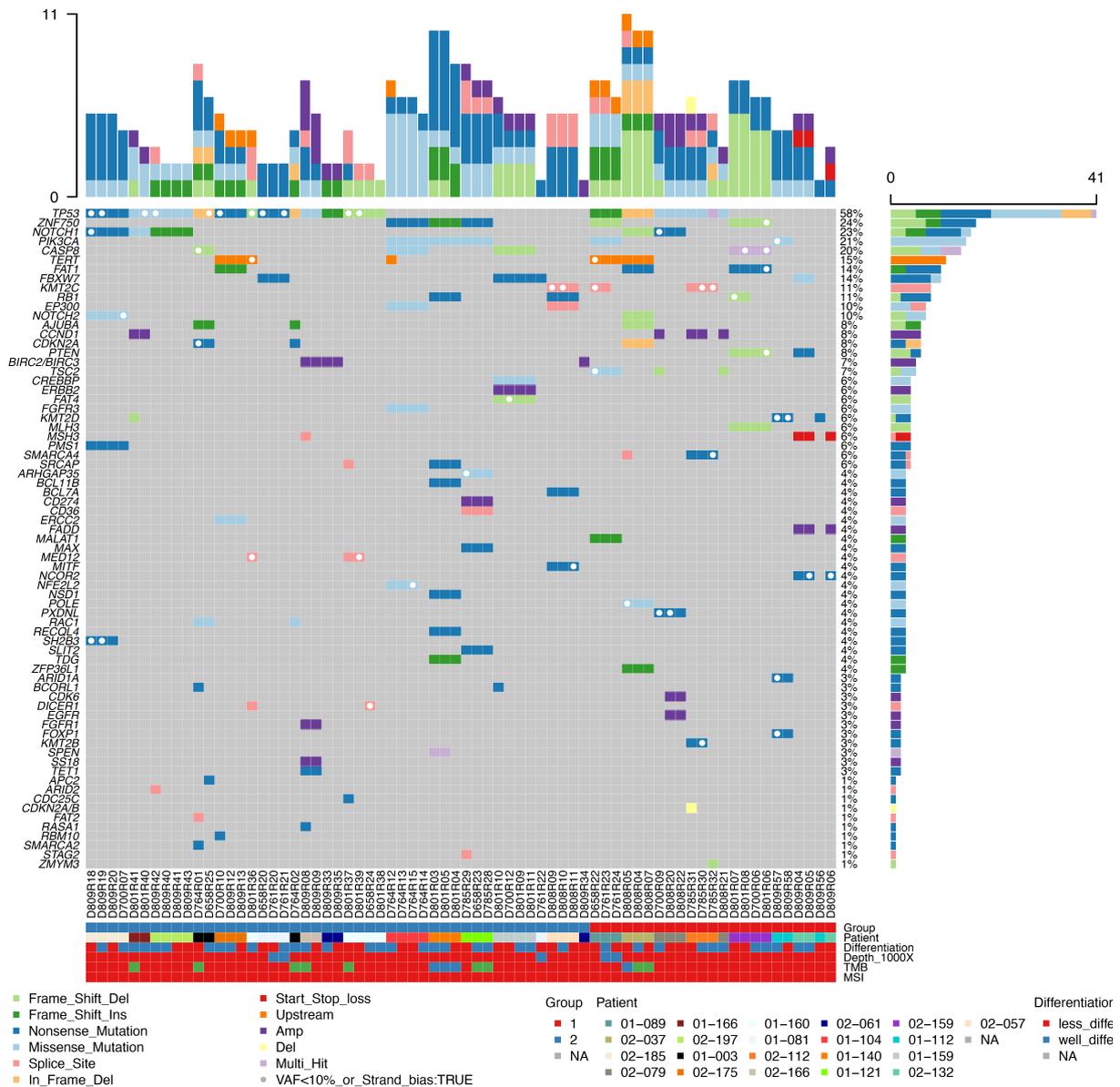


Figure 3.1-4 Oncoprint réalisé sur 21 patients SCANDARE (71 régions au total) avec une hétérogénéité génétique intra-tumorale.

Pour chaque patient, l'oncoprint récapitule les variants pathogènes détectés dans les régions tumorales séquencées. Les profils d'altérations moléculaires sont annotés par niveau d'actionnabilité (groupe 1 actionnable et groupe 2 non actionnable), par grade histologique, pour la charge mutationnelle et pour le statut microsatellitaire (MSI). Seuls les variants avec

une fréquence allélique > 10% sont validés. Les variants hétérogènes impliquant des VAF < 10% et des biais de brin sont matérialisés par un point blanc.



Figure 3.1-5 Oncoprint réalisé sur sept patients SCANDARE (23 régions au total) avec une hétérogénéité génétique intra-tumorale actionnable.

3.1.5 Hétérogénéité transcriptomique intra-tumorale

3.1.5.1 Matériel et méthodes

Nous avons caractérisé l'hétérogénéité du transcriptome chez 78 patients contributifs en DRAGON en utilisant la méthode 3'TAG-RNA-Seq. Les 1000 gènes codants les plus variables (comptages bruts) entre les régions tumorales ont été sélectionnés pour des analyses exploratoires (analyses en composantes principales [ACP] et regroupements hiérarchiques) et des analyses d'expression différentielle de gènes. Les comptages ajustés sur la profondeur de séquençage et la taille des gènes à l'étape de normalisation sont rapportés en TPM (*Transcripts Per Kilobase Million*).

En utilisant des comptages normalisés transformés *rlog* (*Regularized Log Transform*), les ACP ont été réalisées par région tumorale (annotée selon le niveau de différenciation histologique, l'infiltrat lymphocytaire, la charge mutationnelle et le score CPS) et par patient (annoté selon l'âge, le sexe, le statut éthylo-tabagique, le sous-type anatomique tumoral, le stade T, le stade N, le statut HPV 16 et le niveau du score d'hétérogénéité pathologique). Dans les ACP rendues par patient, la moyenne des comptages bruts des régions tumorales a été calculée. Les effets *batch* (dates de *processing*, *run* et site de conditionnement des blocs FFPE) ont été préalablement éliminés.

Les analyses d'expression différentielle ont été réalisées en utilisant les comptages normalisés selon la méthode TMM (*Trimmed Mean of M values*)²⁶⁸. Pour pouvoir estimer l'abondance des transcrits selon plusieurs conditions et tester les différences, nous avons ajusté un modèle de régression linéaire multiple sans constante incorporant les variables sélectionnées à l'étape d'analyse non supervisée. Le modèle linéaire a été ajusté avec *limma* dans R²⁶⁹ en exécutant le script : `model.matrix(~0 + variables)`.

Les gènes les plus contributifs pour la variabilité des axes principaux en ACP et les gènes les plus significatifs pour l'expression différentielle ont été testés dans des analyses d'enrichissement de voies de signalisation en utilisant *g* : *Profiler*²⁷⁰ et les bases de données KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)²⁷¹ et *Reactome*²⁷².

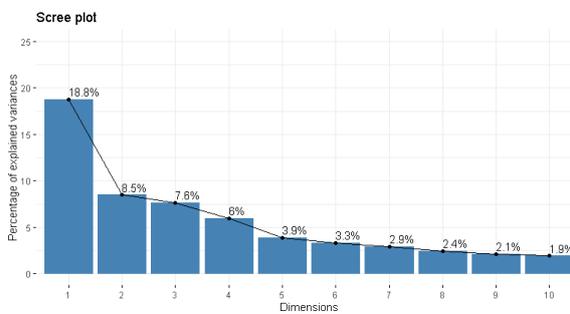
3.1.5.2 Résultats

Soixante-dix-huit patients (197 régions tumorales au total) ont été séquencés en ARN en 3'TAG-RNA-Seq. Les comptages bruts étaient disponibles pour 57 820 transcrits. Pour chaque région tumorale, ~15 000 transcrits (TPM \geq 1) étaient exprimés.

Nous présentons dans un premier temps les résultats obtenus avec les ACP. Pour les ACP rendues par patient ($n = 78$), le pourcentage d'inertie expliqué par les quatre premières

dimensions était de l'ordre de 41% (Figure 3.1-6A). Autrement dit, les deux premières dimensions de variabilité permettaient d'expliquer 27% de l'information contenue dans le set d'expression et les dimensions 3 et 4 permettaient d'en expliquer 14%. Nous avons caractérisé les gènes contribuant le plus fortement à la construction des dimensions 1 à 4 (Figure 3.1-6B). Ces contributions permettaient de savoir si un axe était surtout construit à cause d'un seul ou de quelques transcrits. Nous rapportons enfin les voies KEGG et Reactome impliquées dans cette variabilité (Tableau 3-2).

A



B

	Dim1	Dim2	Dim3	Dim4
TOP	Gene	Gene	Gene	Gene
1	DSG1	SYNPO2	ATP13A4	MLXIPL
2	KRT6B	ENO3	FUT3	CHRM3
3	KRT6C	CA3	ADGRF1	GPX2
4	LCE3D	SRL	CLDN4	MPPED1
5	LCE3E	AMOT	TTC9	RAB3B
6	IVL	PRKAA2	TMPRSS11A	CYP251
7	KLK7	MYH2	SCNN1A	B4GALNT4
8	SPRR2G	MYOM2	CLCA4	NOS1
9	GSDMA	CMYA5	LIPH	SCN9A
10	HEPDL1	RBFOX1	SPRR3	CXCL10
11	KRTDAP	MYBPC1	CEACAM5	ARFGF3
12	SPRR2B	CASQ1	POF1B	IDO1
13	IL36RN	DUSP26	FUT6	B4GALNT1
14	RNF222	MB	CXCL17	GLI1
15	CRCT1	TNNC2	SCEL	FOXL2
16	CDA	ATP1A2	CEACAM6	SLC6A8
17	CDSN	MYOZ1	KRT24	IGFBP2
18	TUBB2A	BEST3	CSTA	SAMD5
19	DEFB103A	COX6A2	FAM3D	GDA
20	SDR9C7	PGAM2	KRT13	NKX2-1

Figure 3.1-6 Pourcentage d'inertie des axes de l'ACP (78 patients) et gènes contributifs.

(A) Pourcentage d'inertie expliquée par chaque axe. (B) Gènes les plus contributifs (top 20).

Tableau 3-2 Analyses d'enrichissement des gènes contributifs de l'ACP.

Dataset	Voie de signalisation [¶]	Dimension 1	Dimension 2	Dimension 3	Dimension 4
		Intersection			
KEGG	Cardiac muscle contraction	<i>ATPIA2, TNNC1, CASQ2, COX6A2, ACTC1, MYL2</i>	<i>ATPIA2, COX6A2, TRDN, ATP2A1, MYH7, ACTC1</i>		
KEGG	Hypertrophic cardiomyopathy	<i>TNNC1, DES, TTN, ACTC1, SGCA, MYL2</i>	<i>PRKAA2, TTN, ATP2A1, MYH7, ACTC1, MYL2</i>		
KEGG	Dilated cardiomyopathy	<i>TNNC1, DES, TTN, ACTC1, SGCA, MYL2</i>	<i>TTN, ATP2A1, MYH7, ACTC1, MYL2, CACNA1S</i>		
KEGG	Adrenergic signaling in cardiomyocytes	<i>PPP2RC2, PPP1R1A, ATPIA2, TNNC1, ACTC1, MYL2</i>	<i>ATPIA2, ATP2A1, MYH7, CAMK2B, ACTC1, MYL2</i>		
KEGG	IL-17 signaling pathway			<i>LCN2, MMP1, MMP13, S100A8, MMP3, S100A9</i>	
KEGG	Glycosphingolipid biosynthesis [§]			<i>FUT3, FUT6</i>	
Reactome	Keratinization	<i>DSG1, KRT68, KRT6C, LCE3D, LCE3E, IVL</i>	<i>SPRR3, KRT24, CSTA, KRT13, KRT78, SPRR1A, KRT4</i>		
Reactome	Developmental biology [§]	<i>DSG1, KRT6B, KRT6C, LCE3D, IVL, SPRR2G</i>			
Reactome	Developmental biology		<i>SPRR3, KRT24, CSTA, KRT13, CDH2, KRT78</i>		
Reactome	Muscle contraction [§]			<i>MYBPC1, CASQ1, TNNC2, ATPIA2, TTN, TRDN, NEB</i>	
Reactome	Insulin-like Growth Factor-2 mRNA Binding Proteins				<i>IGF2BP2, IGF2BP1, IGF2BP3</i>

[¶]Les analyses d'enrichissement ont été faites en utilisant les gènes du top 200 contribuant à la construction des quatre premiers axes de l'ACP ; [§]Voies de signalisation enrichies parmi les gènes du top 20.

Dans l'ACP par région tumorale ($n = 197$), nous avons annoté les régions selon le niveau de différenciation histologique (peu différencié vs bien différencié). Les régions tumorales n'étaient pas séparées dans le plan composé des deux premières dimensions de variabilité indiquant que la différenciation histologique n'était pas une source de variabilité des transcrits (Figure 3.1-7A). Dans l'ACP par patient ($n = 78$), le statut HPV 16, le sous-type tumoral et le score d'hétérogénéité pathologique permettaient de séparer les patients le long du premier axe indiquant leur rôle dans la variabilité des transcrits (Figure 3.1-7B-D).

Nous avons identifié les gènes différentiellement exprimés les plus significatifs selon le statut HPV 16 (négatif vs positif), le sous-type tumoral (cavité orale vs les autres localisations) et le score d'hétérogénéité pathologique (I-II vs III). Des regroupements hiérarchiques des 50 gènes les plus significatifs ont été réalisés confirmant visuellement le *clustering* des patients selon les modalités de la variable de regroupement (Figure 3.1-8A-C).

Les gènes les plus significatifs définis par $p \leq 0.05$ et un log ratio classe d'intérêt/classe de référence (FC, *Fold Change*) $|\log FC| \geq 1$ ont été sélectionnés pour les analyses d'enrichissement (Figure 3.1-8A-C). Nous rapportons :

- Une voie KEGG *IL-17 signaling pathway* (incluant *CCL11*, *PTGS2*, *MMP1/3* et *MAPK10*) impliquée dans l'expression différentielle selon le sous-type tumoral ;
- Des voies Reactome *cell junction* et *tight junction interaction* (incluant *CLDN1/4*, *COL17A1*, *CDH2* et *LAMC2*) impliquées dans l'expression différentielle selon le score d'hétérogénéité pathologique ;
- Des voies KEGG *cytokine-cytokine receptor interaction* et *viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor* (incluant *RPA2*, *ZNF541*, *CCNE2*, *CDKN2A* et *POLE2*) impliquées dans l'expression différentielle selon le statut HPV 16.

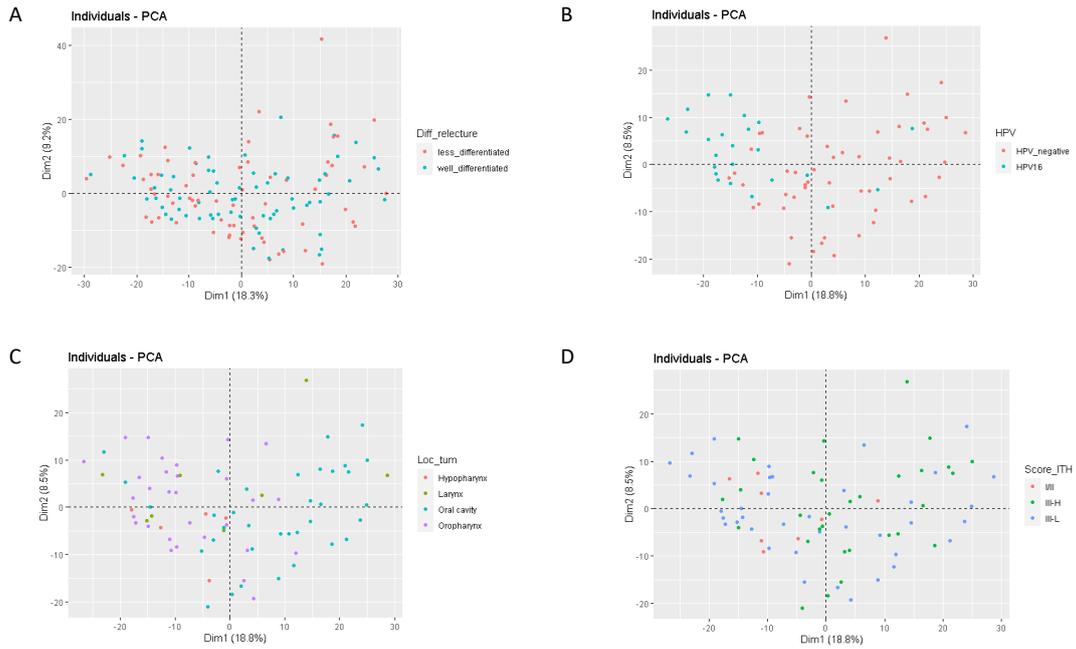


Figure 3.1-7 ACP rendues pour 78 patients et 197 régions tumorales.

Les régions tumorales annotées selon le niveau de différenciation histologique n'étaient pas séparées dans le plan d'inertie formé des deux premiers axes (A). Les patients annotés selon le statut HPV 16 (B), le sous-type tumoral (C) et le score d'hétérogénéité pathologique (D) étaient bien séparés le long du premier axe indiquant un rôle de ces variables dans la variabilité des transcrits.

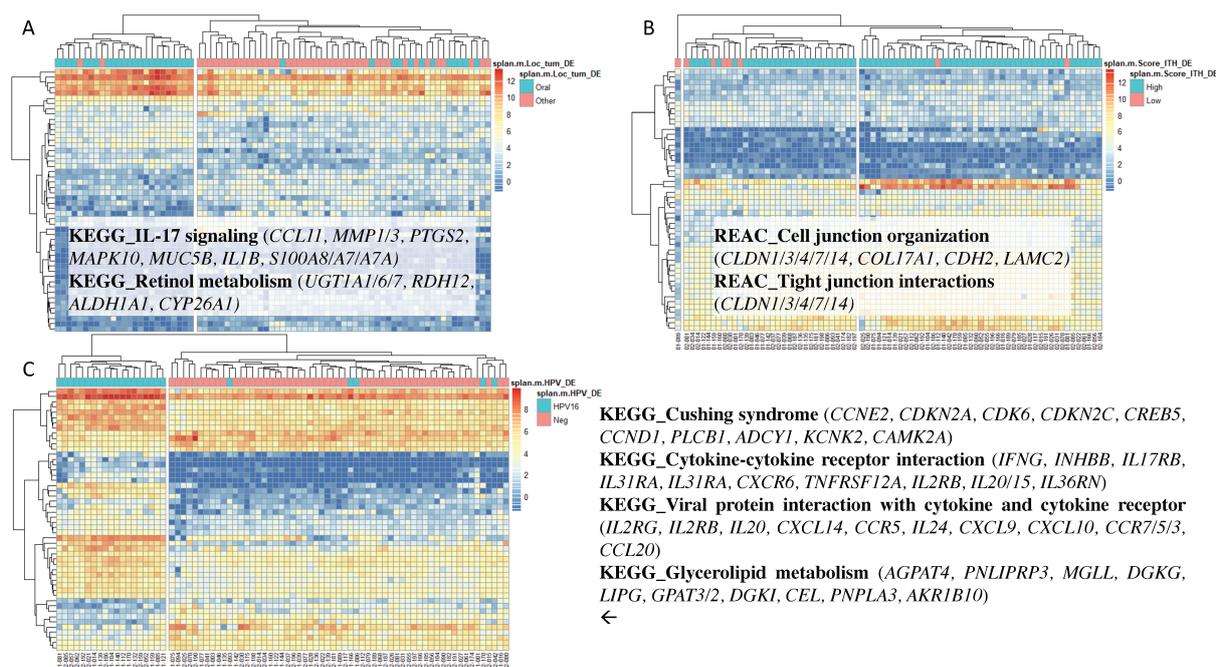


Figure 3.1-8 Analyses par regroupement hiérarchique rendues pour 78 patients selon le sous-type tumoral (A), le score d'hétérogénéité pathologique (B) et le statut HPV 16 (C).

Les regroupements hiérarchiques ont utilisé les 50 gènes différemment exprimés les plus significatifs pour lesquels p ajustée < 0.05 et $|\log\text{FC}| > 1$. Les analyses d'enrichissements ont utilisé tous les gènes significatifs pour lesquels $p < 0.05$ et $|\log\text{FC}| > 1$. Le score d'hétérogénéité pathologique a été regroupé en deux niveaux faible (score I-II) et fort (score III).

3.1.6 Discussion

En utilisant les prélèvements tissulaires de CETC localisés et collectés dans l'étude prospective de *biobanking* SCANDARE, nos travaux ont validé la faisabilité d'un séquençage multirégional du génome et du transcriptome guidé par l'annotation spatiale des régions tumorales histologiquement peu et bien différenciées. En orientant les séquençages vers des régions tumorales de forte cellularité et hétérogènes d'un point de vue histologique, nous avons cherché à augmenter la sensibilité des analyses moléculaires (c'est-à-dire la détection de variants avec des fréquences alléliques faibles) et les chances de détecter une hétérogénéité génétique intra-tumorale.

Nous avons mis au point un score d'hétérogénéité pathologique récapitulant la part relative de contingent peu et bien différencié d'une tumeur. Nous rapportons une association significative entre l'hétérogénéité qui existe au niveau histologique et l'exposition au tabac. Nous avons

également confirmé la valeur pronostique positive des TILs dans des modèles de survie multivariés^{273,274}. Toutefois, le score d'hétérogénéité pathologique n'était pas pronostique dans notre cohorte. Il n'est pas exclu que les événements cliniques au moment des analyses après un suivi médian de 17 mois aient été insuffisants pour détecter une association avec le risque de récurrence. Une actualisation des données de survie réalisée en août 2023 devrait permettre de consolider ce résultat.

Sur le plan génomique, le séquençage de l'ADN de plusieurs régions tumorales par patient a montré une hétérogénéité génétique intra-tumorale chez 37% d'entre eux. Parmi ces patients hétérogènes, 32% présentaient une hétérogénéité du point de vue de variants actionnables incluant des biomarqueurs thérapeutiques avec le plus haut niveau de preuve de la classification OncoKB (*PIK3CA*, *EGFR* et *TSC2*).

Sur le plan transcriptomique, les analyses exploratoires non supervisées ont identifié des profils d'expression de gènes variables selon la localisation tumorale, le statut HPV 16 et le score d'hétérogénéité pathologique validés secondairement dans des modèles de régression linéaire. Nous avons précisé les voies de signalisation impliquées dans ces profils d'expression différentielle. En particulier, nous montrons que le score d'hétérogénéité pathologique est lié à l'activation différentielle des voies Reactome de la jonction cellulaire.

La caractérisation de l'hétérogénéité génétique a été rendue possible dans SCANDARE grâce (i) au recrutement prospectif des patients, (ii) au recueil de plusieurs prélèvements par patient, (iii) à l'application de méthodes standardisées de prélèvements, de *processing* et de séquençage, (iv) à l'implémentation d'analyses multiomiques, (v) à l'utilisation de formulaires électroniques pour le recueil des données cliniques et (vi) à l'utilisation de pipelines bioinformatiques reproductibles²⁷⁵.

3.1.7 Perspectives et publications

Les résultats obtenus pour les travaux sur l'hétérogénéité histologique intra-tumorale seront présentés au congrès annuel de l'ESMO 2023 en session poster. L'abstract *Prognostic value of pathological intratumor heterogeneity in patients with head and neck squamous cell carcinoma treated with upfront surgery* est disponible en Annexe 4.1.4.

En tirant parti de l'actualisation des données de survie réalisée en août 2023, nous travaillons actuellement à la caractérisation pronostique de l'hétérogénéité génétique intra-tumorale ainsi qu'à la mise au point d'une signature d'expression pronostique basée sur les 100 gènes les plus variables entre les patients.

Nous précisons l'abondance du micro-environnement tumoral en cellules immunitaires et épithéliales dans les régions tumorales identifiées à l'étape d'annotation des lames HES en utilisant respectivement l'algorithme de déconvolution MCP-counter²⁷⁶ et une signature d'expression de 14 gènes testée dans les CETC²³¹. L'hétérogénéité du micro-environnement tumoral sera évaluée en comparant les régions entre elles et en évaluant l'association entre l'abondance du micro-environnement en cellules immunitaires et le score d'hétérogénéité pathologique.

Nous caractériserons la composition clonale des CETC en incorporant les données de cellularité tumorale, de CNV et de VAF (obtenues par séquençage multirégional du génome) dans l'algorithme bioinformatique PyClone¹⁰⁴ pour l'inférence des clusters mutationnels. Les arbres phylogénétiques seront construits secondairement en utilisant l'algorithme CITUP²⁷⁷. Nos résultats devraient permettre d'identifier des trajectoires évolutives redondantes dans les CETC et d'en préciser leur valeur pronostique.

L'ensemble des résultats décrits dans ce chapitre et les analyses à venir devraient permettre la rédaction d'un manuscrit à l'hiver 2023.

3.2 Résultats sur l'hétérogénéité intra-tumorale temporelle à récurrence

3.2.1 Introduction

Une tumeur peut être conçue comme un écosystème constitué de plusieurs sous-populations de cellules malignes (*clones cellulaires*) en voie de transformation ou déjà transformées (dont une population cellulaire numériquement majoritaire correspondant à celle en phase de dominance clonale) et dont les proportions relatives varient au cours du temps à l'origine d'une hétérogénéité temporelle. Cette évolution de la composition clonale au cours du temps est façonnée par un équilibre dynamique entre les sous-clones, la pression de sélection du micro-environnement ou du traitement et la sélection naturelle.

Dans les CETC, l'analyse comparée des génomes des tumeurs primitives et des métastases conforte l'existence d'une hétérogénéité génétique au cours du temps. Son importance est déterminée par la chronologie des événements moléculaires clonaux conférant le potentiel métastatique. Les études opposent classiquement le modèle linéaire de sélection clonale (où les métastases dérivent d'un clone qui apparaît tardivement dans la tumeur primitive)^{118,226,229} à la progression parallèle de la tumeur primitive et des métastases (lesquelles dérivent de clones

présents dès le début du développement de la tumeur primitive)^{226,230} caractérisée par une plus grande hétérogénéité génétique. Un processus de branchement évolutif conduisant à la perte du clone dominant dans les métastases a enfin été rapporté dans ~32% des CETC. Cette évolution clonale semble corrélée à un mauvais pronostic en comparaison d'un équilibre ponctué pour lequel la composition clonale est relativement stable au cours de l'évolution métastatique²²⁷. Les indications de thérapies ciblées sont souvent posées sur la base d'une seule biopsie (réalisée le plus souvent au diagnostic). La prise en compte de l'hétérogénéité génétique qui existe au cours du temps impose de répéter des biopsies souvent invasives et difficiles d'accès. Du reste, en raison de l'hétérogénéité qui existe entre les métastases⁷, une seule biopsie métastatique ne récapitule qu'imparfaitement la complexité génétique d'une tumeur.

L'analyse du ctDNA obtenu par biopsie liquide permet de caractériser plus facilement et de façon répétée les altérations moléculaires présentes dans l'ensemble de la tumeur primitive et de ses métastases ainsi que leurs évolutions au cours du temps^{256,257}. Son étude à différents *timepoints* couplée à la caractérisation phylogénétique de la tumeur primitive permet en outre d'appréhender l'évolution clonale et le processus de sélection qui opère à progression¹³⁷. Dans les CETC localisés ou plus avancés, plusieurs études non interventionnelles suggèrent une utilité clinique du ctDNA en particulier pour la stratification pronostique²⁵⁸, la surveillance postopératoire (en monitorant la maladie résiduelle minimale)²⁷⁸⁻²⁸², l'identification de biomarqueurs théranostiques^{259,283} et la prédiction de la rechute sous traitement^{260,261}. Plusieurs études ont montré l'intérêt d'un *monitoring* de l'ADN circulant d'HPV pour la détection précoce de rechute des cancers de l'oropharynx viro-induits²⁸⁴⁻²⁸⁸ mais là-encore sans essai prospectif disponible apportant la preuve d'une utilité clinique (la capacité à orienter une décision thérapeutique basée sur la démonstration d'un bénéfice en survie).

Dans le cadre de ma thèse de sciences, nous avons cherché à appréhender une hétérogénéité temporelle au cours de la progression tumorale en utilisant les données de séquençage des tissus générées dans SCANDARE et les données de séquençage des ctDNA obtenues grâce à une collaboration avec la société belge OncoDNA (<https://www.oncodna.com/en/main/home/>). Nous avons utilisé un panel NGS ciblé (OncoFOLLOW™) composé d'un panel fixe de 40 gènes (*core panel*) complété par un panel à façon pouvant contenir jusqu'à 21 variants identifiés dans les tissus. Les travaux dédiés spécifiquement à l'étude de l'hétérogénéité temporelle s'inscrivaient dans un projet de recherche plus large dont les objectifs étaient les suivants :

- Evaluer la faisabilité d'un panel NGS ciblé pour la détection et le *monitoring* du ctDNA ;

- Evaluer le potentiel du ctDNA comme biomarqueur d'une hétérogénéité intra-tumorale spatiale et temporelle ;
- Evaluer la validité clinique de la détection d'une maladie résiduelle minimale basée sur la détection du ctDNA.

J'ai pu collaborer à l'interprétation et à la sélection des variants pathogènes détectés dans les tissus et les ctDNA. Ma contribution a également consisté (i) à implémenter et à consolider la base de données cliniques incluant une actualisation des données de survie, (ii) à réaliser des analyses de données de séquençage des tissus et des ctDNA intégrées aux données cliniques en programmant des *oncoprints*, (iii) à modéliser et à interpréter des trajectoires temporelles individuelles annotées pour les événements moléculaires et cliniques en programmant des *swimmerplots*, (iv) à réaliser des analyses de sensibilité et à évaluer la validité clinique d'une maladie résiduelle minimale basée sur la détection du ctDNA, (v) à réaliser des modèles de survie et des modèles pronostiques multivariés ainsi que l'ensemble des tests et des statistiques descriptives et (vi) à réaliser l'ensemble des figures et à rédiger le manuscrit.

Les analyses sont finalisées et un manuscrit rédigé intégralement et formaté pour *Nature Communications* est joint au chapitre suivant.

3.2.2 Article #1 Addressing molecular relapse and intra-tumor heterogeneity in head and neck cancer with circulating tumor DNA

**Addressing molecular relapse and intra-tumor heterogeneity in head and neck cancer
with circulating tumor DNA**

Grégoire Marret¹, Constance Lamy¹, Sophie Vacher², Luc Cabel³, Mathieu Séné², Ladidi Ahmanache², Laura Courtois², Zakhia El Beiano⁴, Jerzy Klijanienko⁴, Charlotte Martinat⁴, Nicolas Servant⁵, Choumouss Kamoun⁵, Maral Halladjian¹, Thierry Bronzini⁶, Cédric Balsat⁷, Jean-François Laes⁷, Aubray Prévot⁷, Sébastien Sauvage⁷, Maxime Lienard⁷, Emmanuel Martin⁷, Bérengère Genin⁷, Nathalie Badois⁸, Maria Lesnik⁸, Antoine Dubray-Vautrin⁸, Olivier Choussy⁸, Wahib Ghanem⁸, Rabah Taouachi⁸, Julien Masliah Planchon², Ivan Bièche^{2*}, Christophe Le Tourneau^{1,9*}, Maud Kamal^{1*}

1: Department of Drug Development and Innovation (D3i), Institut Curie, Paris-Saclay University, Paris, France; 2: Pharmacogenomics Unit, Genetics Department, Institut Curie, Paris, France; 3: Department of Medical Oncology, Institut Curie, Paris, France; 4: Department of Pathology, Institut Curie, Paris, France; 5: Bioinformatics and Computational Systems Biology of Cancer, PSL Research University, Mines Paris Tech, INSERM U900, Paris, France; 6: Department of Pathology, Centre des Ressources Biologiques, Institut Curie, Paris, France; 7: OncoDNA, Gosselies, Belgium; 8: Department of Oncologic Surgery, Institut Curie, PSL Research University, Paris & Saint-Cloud, France; 9: INSERM U900 Research Unit, Institut Curie, Saint-Cloud, France

Corresponding author

Prof. Christophe Le Tourneau, MD PhD

Institut Curie

Department of Drug Development and Innovation (D3i)

26 Rue d'Ulm, 75005 Paris, France

Phone/Fax : +33-1-4432-4675/+33-1-5310-4006

E-mail : christophe.letourneau@curie.fr

*Equal contribution

Word count Title = 15 (max 15); Abstract = 150 (max 150); Text = 4,041 (max 5000); Figures = 9; Table = 1 (max 10 tables and/or figures); Supplementary Figures = 2; Supplementary Table = 1; Supplementary Software = 1; Supplementary Materials = 1; References = 47 (max 70); Pages = 28

Running title ctDNA in early-stage HNSCC

Abstract

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is characterized by molecular intra-tumor heterogeneity (ITH). Treatment response assessment relies on radiologic imaging, which cannot detect minimal residual disease (MRD). We assessed the relevance of ctDNA as a marker for ITH and MRD in HNSCC. Targeted next-generation sequencing was performed on resected tumor tissues and serial blood samples collected from early-stage HNSCC patients in SCANDARE (NCT03017573). We detected ctDNA in 21/41 patients (51%) at surgery and in 15/22 patients (68%) at recurrence, and revealed clinically relevant spatial and temporal ITH in 3/21 patients (14%) and 9/21 patients (43%), respectively. ctDNA-based MRD detection anticipated clinical recurrence by 9.9 months in 17/27 patients (63%). When detected within 14 weeks after surgery, MRD correlated with disease recurrence after adjusting for prognostic variables (HR = 3.0; $p = 0.03$). Early detection of ctDNA after surgery might be of interest to stratify HNSCC patients for adjuvant therapy.

Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the seventh most common cancer worldwide¹. Early-stage disease can be successfully treated with a single-modality treatment (surgery or radiotherapy), whereas locally advanced disease usually uses multimodality treatments that involve surgery and (chemo)radiotherapy. Around 50% of locally advanced HNSCC recur after primary treatment, at locoregional and/or distant metastatic levels². Locoregional recurrence can still be treated with salvage surgery or re-irradiation, both of which being associated with a reduced mortality risk by 49% and 28% respectively². In contrast, patients who are not amenable to local treatments have a dismal prognosis (i.e., 6 to 9 months in the absence of treatment)³. The current treatment strategy is based on tumor location and disease stage and does not take into account the underlying etiology of HNSCC (e.g., infection with high-risk human papillomavirus [HPV] or heavy use of tobacco and alcohol)⁴, although HPV has been shown to be associated with a better prognosis⁵.

HNSCC is characterized by substantial heterogeneity at the molecular level⁶. Tumor heterogeneity has been associated with a dismal prognosis due to decreased response to treatment and higher rates of relapse, even in HPV-positive HNSCC patients^{7,8}. In patients undergoing upfront surgery, prognostic factors for HNSCC include positive surgical margins, extranodal spread, vascular tumor embolism, and disease stage⁹, but do not incorporate information that emerges over time. In fact, the natural course of the disease and treatment pressure select specific tumor clones with molecular characteristics that may impact patients prognosis¹⁰. Treatment response assessment relies on conventional imaging and positron-emission tomography, which cannot detect disease at the molecular level. Moreover, the characterization of the mutational landscape for guiding precision medicine requires invasive and repeated tissue biopsies, which might not capture spatial intra-tumor heterogeneity or clonal dynamics over time.

A non-invasive way to overcome these limitations is the detection and analysis of circulating tumor DNA (ctDNA), a fraction of double-stranded DNA fragments that are freely released from tumor cells into the bloodstream^{11,12}. ctDNA detection methods often rely on identification of tumor-specific alterations using digital PCR or next-generation sequencing (NGS) techniques. Such targeted approaches have been successfully implemented in small proof of concept studies in early-stage HNSCC for minimal residual disease (MRD) detection following curative-intent surgery¹³⁻¹⁷. On the other hand, tissue-agnostic methods (e.g., without prior knowledge of somatic mutations in the solid tumor) have enabled identification of potentially actionable mutations and emerging resistant tumor subclones in patients with advanced HNSCC¹⁸⁻²¹.

We hypothesized that targeted NGS for ctDNA sequencing could be effective in detecting MRD while providing clinically relevant insights on tumor heterogeneity in early-stage HNSCC. Based on the prospective SCANDARE HNSCC patients' cohort (NCT03017573) treated with curative-intent upfront surgery, we sought to assess (i) the feasibility of a dedicated targeted NGS approach for ctDNA detection and monitoring, (ii) the potential of ctDNA as a biomarker of tumor heterogeneity, and (iii) the clinical validity of ctDNA-based MRD detection.

Results

Patient characteristics and sample collection

Forty-three HNSCC patients treated with upfront curative-intent surgery in the prospective biobanking SCANDARE study were included. Multiregion targeted NGS was performed on tumor tissues obtained at the primary surgery by using a custom panel of 571 genes. Two patients did not pass our filtering criteria due to low-coverage sequencing (1000x read depth < 5%) and aberrant tumor mutational burden (TMB) > 400 Mut/Mb. Forty-one patients displayed trackable mutations on tumor tissues, which were further prioritised to build patient-specific

panels of up to 21 variants combined with a fixed core panel of 40 genes for targeted NGS on plasma. Among them, 31 patients (76%) showed recurrent disease at a median follow-up of 41 months (IQR, 40-50 months, **Figure 1**).

Serial plasma samples were collected at surgery ($n = 41$), within 14 weeks after surgery ($n = 34$), at six months ($n = 18$) and at recurrence ($n = 22$). In total, 41 patients at surgery and 22 patients at recurrence were analyzed for ctDNA profiling. Thirty-seven patients displaying plasma samples within 14 weeks after surgery and/or at six months were monitored by targeted sequencing of ctDNA for postoperative surveillance (**Figure 1**).

The median age at diagnosis was 65 years (interquartile range [IQR], 58-75 years). Thirty-three patients (81%) were male. Twenty-two patients (54%) were current or former smokers and 20 patients (49%) displayed excessive alcohol consumption. Main tumor locations were oral cavity (20/41, 49%) and oropharynx (16/41, 39%). Most patients were diagnosed with a T1-2 stage disease (23/41, 56%) and presented with positive lymph nodes (22/41, 54%) and HPV-negative tumors (30/41, 73%). Overall, 28 patients (68%) received adjuvant (chemo)radiotherapy. Baseline patient characteristics according to recurrence status are summarized in **Table 1**.

Mutational landscape at surgery and dynamic over time

A total number of 172 mutations were identified across tumor tissues at surgery (mean [SD] number, 4.2 [2.2] mutations/patient) whereas 54 mutations were identified in ctDNA at surgery (mean [SD] number, 2.6 [1.7] mutations/patient). In postoperative ctDNA-positive blood samples, we identified 22 mutations within 14 weeks after surgery (mean [SD] number, 1.5 [0.7] mutations/patient), eight mutations at six months (mean [SD] number, 1.3 [0.5] mutations/patient), and 34 mutations at recurrence (mean [SD] number, 2.3 [1.4] mutations/patient). A number of mutations were detected only in tumor tissue ($n = 108$), in both

tumor tissue and serial ctDNA-positive blood samples ($n = 6$), and only in ctDNA-positive blood samples ($n = 13$, **Figure 2**).

At surgery, tumor tissue and ctDNA exhibited similar mutational landscapes (**Figure 3A-B**) with frequent mutations in *TP53* (16.0% vs 21.2%, respectively), *FAT1* (6.8% vs 1.9%, respectively), *NOTCH1* (5.6% vs 7.7%, respectively), *PIK3CA* (4.3% vs 5.8%, respectively), *CASP8* (3.1% vs 3.8%, respectively), *ZNF750* (2.5% vs 1.9%, respectively), *FBXW7* (1.9% each), *KMT2C* (1.9% each), *RAS* (1.2% vs 5.8%, respectively), and *SLIT2* (1.2% vs 3.9%, respectively). However, *CDKN2A* and *PTEN* were found to be only altered in tumor tissue (3.7% and 1.9%, respectively).

At recurrence, ctDNA exhibited a higher prevalence of mutated *TP53* (31.2%), *FAT1* (9.4%), *IDH1* (6.2%), *NOTCH1* (6.2%) and *RAS* (6.2%), whereas no mutations were detected in *CASP8*, *ZNF750*, *FBXW7*, *KMT2C* and *PTEN* (**Figure 3C**).

Spatial intra-tumor heterogeneity

We examined the ability of our dedicated ctDNA assay-panel to provide complementary information on relevant biomarkers to tissue biopsy. We focused on the 21 patients in whom ctDNA was detected at the time of surgical removal of the primary tumor. For three patients (14%), we identified novel mutations in ctDNA encompassing *TP53*, *HRAS* and *NRAS* that were not found in the respective tumor tissue. All three patients provided two to four tumor regions which were further tested negatively for these mutations. Genomic profiles of the 41 HNSCC patients, as determined by sequencing tumor tissues and ctDNA at surgery, were annotated for spatial intra-tumor heterogeneity (**Figure 4** and **Supplementary Figure 1**).

We further examined whether tumor heterogeneity unravelled by the assay-panel had clinical utility. Based on the OncoKB Precision Oncology Database²², we reported two mutations in *NRAS* (p.T58I) and *HRAS* (p.G13D) that have supporting clinical evidence of actionability

(OncoKB levels 2 and 3A), as well as one mutation in *TP53* (p.G154S) with high prognostic utility (OncoKB level Px1).

Temporal intra-tumor heterogeneity

We assessed whether longitudinal ctDNA profiling on postoperative blood samples could reveal the emergence of mutations associated with HNSCC recurrence. We focused on the 21 patients in whom ctDNA was detected following tumor resection and/or at disease recurrence. For nine patients (43%), we identified novel mutations in ctDNA encompassing *TP53*, *AR*, *KRAS*, *PTEN*, *IDH1*, *JAK3* and *DDR2*, which were found neither in ctDNA at surgery nor in the respective tumor tissue. Seven patients out of the nine provided three to five tumor regions which were further tested negatively for these potentially emerging mutations, preventing us from overestimating tumor heterogeneity. Genomic profiles of the 41 HNSCC patients, as determined by sequencing tumor tissue and serial ctDNA-positive blood samples, were annotated for spatiotemporal intra-tumor heterogeneity (**Figure 5** and **Supplementary Figure 2**).

We next queried whether emerging mutations detected by longitudinal ctDNA profiling were actionable. We identified four mutations in *IDH1* (p.R132H and p.R132C) and *KRAS* (p.G12C) that have supporting clinical evidence of actionability (OncoKB level 1) altogether with one actionable mutation in *PTEN* (p.D326N) supported by substantial research evidence (OncoKB level 4), one mutation in *TP53* (p.M237I) with high prognostic utility (OncoKB level Px1) and four mutations in *AR* (p.V731M), *KRAS* (p.Q22*), *JAK3* (p.Q489*) and *DDR2* (p.Q851E) not annotated by OncoKB.

Association between ctDNA detection and clinical setting

An overview of longitudinal ctDNA profiling according to whether the patient received adjuvant (chemo)radiotherapy ($n = 28$) or not ($n = 13$) is shown in **Figure 6**.

At surgery, ctDNA was detected in 21/41 patients (median allele frequency, 2.5%; IQR, 0.7-13.1% VAF) corresponding to a sensitivity of 51% (95% CI, 35-67%). At recurrence, ctDNA was detected in 15/22 patients (median allele frequency, 5.7%; IQR, 1.0-27.9% VAF) corresponding to a sensitivity of 68% (95% CI, 45-86%).

We next assessed the relevance of our dedicated ctDNA assay-panel as a marker for MRD. Among the 37 patients in whom blood samples were available for postoperative surveillance, 27 patients experienced disease recurrence. ctDNA was detected prior to progression in 17/27 patients at levels as low as 0.1% VAF (median allele frequency, 1.6%; IQR, 0.6-15.1% VAF) corresponding to a sensitivity of 63% (95% CI, 42-81%). Since all 10 patients who did not relapse remained negative for ctDNA, our technique displayed a specificity of 100% (96% CI, 69-100%). The positive predictive value was 100% (95% CI, 80-100%) while the negative predictive value was 50% (95% CI, 27-73%). The median lead-time between the first ctDNA-positive blood sample (taken post-operatively) and clinical recurrence was 9.9 months (IQR, 8.0-14.5 months).

Association between ctDNA detection and clinical outcome

We analyzed survival according to ctDNA-based MRD status (e.g., detected or not for any mutation in the postoperative surveillance setting). On univariate analysis, MRD was a strong predictor of recurrence-free survival (RFS) when detected within 14 weeks after surgery (HR = 4.4; 95% CI, 1.8-10.7; $p = 0.0009$) and at six months (HR = 11.0; 95% CI, 2.6-46.2; $p = 0.001$; **Figure 7**). In addition, MRD was a predictor of overall survival (OS) when detected within 14 weeks after surgery (HR = 4.5; 95% CI, 1.2-17.1; $p = 0.03$) but not at six months (HR = 2.3; 95% CI, 0.3-16.7; $p = 0.4$; **Figure 8**).

After adjusting for clinicopathologic variables (including age, sex, T classification, lymph node involvement, and HPV status), the presence of MRD within 14 weeks after surgery remained an independent predictor of RFS (adjuvant therapy-stratified HR, 3.0; 95% CI, 1.1-7.9; $p = 0.03$) but not of OS (adjuvant therapy-stratified HR, 3.1; 95% CI, 0.5-21.2; $p = 0.2$; **Figure 9**). Given the small number of observations for the number of regression coefficients estimated in the model, the prognostic significance of MRD at six months was not examined.

Finally, on univariate analysis, ctDNA detection at surgery did not correlate with RFS (HR = 1.6; 95% CI, 0.8-3.3; $p = 0.2$) and OS (HR = 3.0; 95% CI, 0.9-9.6; $p = 0.06$). In addition, ctDNA at recurrence did not correlate with OS (HR = 1.6; 95% CI, 0.4-6.2; $p = 0.5$).

Discussion

Our study investigated the relevance of targeted NGS on serial ctDNA as a marker for spatiotemporal intra-tumor heterogeneity and MRD in early-stage HNSCC patients treated with upfront curative-intent surgery. ctDNA was detected in 21/41 patients (51%) at surgery and 15/22 patients (68%) at recurrence. Our method revealed spatial intra-tumor heterogeneity in 3/21 patients (14%) and temporal intra-tumor heterogeneity in 9/21 patients (43%). In the postoperative setting, ctDNA was detected ahead of clinical recurrence in 17/27 patients (63%), with a median lead-time of 9.9 months. The presence of MRD within 14 weeks after surgery was a strong and independent predictor for disease recurrence in multivariate analysis (adjuvant therapy-stratified HR, 3.0; 95% CI, 1.1-7.9; $p = 0.03$).

Our dedicated targeted assay-panel for ctDNA sequencing had several advantages. First, targeted sequencing on tumor tissue provided multiple patient-specific molecular targets for follow-up blood samples, thus optimizing ctDNA assay sensitivity²³. Second, the fixed core panel enabled the detection of multiple and novel mutations in ctDNA that may be missed in a single tumor biopsy.

In line with TCGA²⁴, the majority of HNSCC patients in our cohort (most of them being HPV negative) harbored mutations in *TP53*, *FAT1*, *NOTCH1*, *PIK3CA* and *CDKN2A*. The mutational landscape inferred from ctDNA analysis was similar overall to the one derived from tumor tissue. In 14% of patients, however, we identified clinically relevant mutations in ctDNA that were not found in tumor tissue, evidencing spatial heterogeneity. Similarly, targeted NGS on ctDNA from advanced HNSCC patients revealed the presence of additional variants that were missed in the single tumor biopsy in 26% of patients¹⁹.

Our ctDNA assay provided complementary information on actionable mutations to tissue biopsy. Specifically, we reported an activating hotspot missense mutation in *HRAS* (p.G13D) that might be targeted with tipifarnib, a potent and highly selective inhibitor of farnesyltransferase²⁵. We also reported an inactivating missense mutation in *TP53* (p.G154S). Although evidence-based clinical data regarding *TP53* actionability are scarce and preliminary, *TP53* mutations may be indicative of decreased sensitivity to cisplatin in HNSCC^{26,27}.

Our method allowed a comprehensive view of the mutational landscape at recurrence, with mutations in *TP53*, *FAT1* and *NOTCH1* being among the most frequent molecular events. These results were similar to what was previously reported by targeted NGS on tumor tissue of recurrent and/or metastatic HNSCC with the MSK-IMPACT assay-panel²⁸. We also detected emerging mutations in ctDNA in 43% of patients, of which mutations with potential investigational implications in *KRAS* (p.G12C), *PTEN* (p.D326N) and *TP53* (p.M237I)²². Likewise, another study in early-stage HNSCC reported emerging mutations in *HRAS* and *TP53* in 44% of patients, evidencing clinically relevant tumor heterogeneity unappreciated by tumor NGS²⁹.

Our ctDNA assay exhibited different levels of sensitivity for ctDNA detection, ranging from 51% at surgery to 68% at recurrence. In contrast, tumor-guided PCR assays achieved higher sensitivity for ctDNA detection from 70% to 92% in early-stage and advanced HNSCC,

respectively³⁰. These techniques, however, can interrogate only a few loci per analysis and are not suited for biomarker discovery^{13,31}.

In our study, mutations were detected in ctDNA at levels as low as 0.1% VAF, which was sensitive enough for MRD detection. In this regard, ctDNA-positive blood samples were reported in 63% of patients ahead of clinically confirmed recurrence, with a median lead-time of ~10 months. Our results also suggest the potential for incorporation of MRD into future prognostic models in early-stage HNSCC, given its strong and independent prognostic impact on RFS in multivariate analysis. Similar conclusions were reported in HPV-positive HNSCC, the posttreatment HPV ctDNA monitoring being helpful for earlier detection of recurrence³²⁻³⁵. However, interventional studies on so-called “post-adjuvant therapies” are needed to assess whether an earlier intervention initiated at MRD detection and without waiting for clinical recurrence would lead to an improved survival outcomes^{36,37}.

Our study has several limitations. First, different NGS panels and depths of coverage were applied on tumor tissue and ctDNA, which might induce artifacts intrinsic to NGS-based ctDNA assays³⁸. Second, we did not implement tests to control for clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP). CHIP is common with increasing age, prior radiation therapy and tobacco used, potentially causing false-positive results in ctDNA analysis^{39,40}. In particular, mutations in *TP53* and *IDH1* might be associated with CHIP and are difficult to distinguish from tumor-associated mutations⁴¹. Third, the limited number of patients, as well as the lack of predefined regular intervals for postoperative blood sample collection, clinical examination and radiologic imaging did not allow for thorough analysis of the true lead-time.

In conclusion, our dedicated targeted NGS approach for ctDNA sequencing was feasible in early-stage HNSCC and allowed a comprehensive and continuous characterization of tumor heterogeneity that may complement a single tumor biopsy for guiding precision medicine. Our ctDNA assay demonstrated clinical validity for MRD detection. Interventional studies are

needed to refine the clinical utility of our ctDNA assay in stratifying patients for adjuvant therapy or follow-up.

Material and methods

Patients and sample collection

Tumor tissues and blood samples were obtained from early-stage HNSCC patients treated with upfront curative-intent surgery at Institut Curie (Paris, France) between January 17, 2017, and July 12, 2019, in the prospective biobanking SCANDARE study. All samples were obtained in accordance with the ethical guidelines, with the principles of Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki, and with patients' consent. SCANDARE was approved by a national ethics committee (CPP Ile-de-France 3) and by the National Agency for the Safety of Drugs and Health Products (ANSM).

This interventional study allowed the collection of blood and tissue samples at different time points of treatment with the objectives to generate high quality samples and molecular assessments. All patients provided formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks of the primary resected tumor specimen, altogether with ≥ 2 blood samples (including one blood sample collected at surgery). For each patient, one to five geographically separate region(s) of the tumor body were delineated by a pathologist (median [IQR] number, 4 [2-4] regions/patient), and further sequenced by using multiregion targeted NGS. The tumor region with the highest number of pathogenic variants was prioritized to infer the mutational landscape of the whole disease, and to design a dedicated targeted assay-panel for ctDNA sequencing. In additional analysis, data acquired from sequencing non-prioritized tumor regions was manually inspected to control for false-positive tumor heterogeneity assumptions.

Blood samples were collected in EDTA tubes at the time of surgical removal of the primary tumor, within 14 weeks after surgery (median [IQR] time, 3.4 [2.5-4.9] weeks), at six months and at recurrence, if any.

All patients received standard adjuvant therapy (e.g., radiotherapy with or without chemotherapy) or clinical follow-up according to the stage of the disease and usual procedures. A three-year follow-up period was conducted as part of the clinical routine.

Targeted NGS on tissue

Targeted NGS on tumor tissues was performed by using a custom panel of 571 genes (named DRAGON), covering a list of frequently mutated tumor suppressor genes (TSG) and oncogenes in HNSCC. Genes were classified regarding the literature and databases (cBioPortal and OncoKB^{42,43}) in TSG, oncogenes, and genes considered as both an oncogene and a TSG.

DNaseq protocol: Indexed paired-end libraries of tumor DNA were performed using the Agilent Sureselect XT2 library prep kit. The kit supports sequencing targeted regions of the genome spanning 2.7 Mb. About 50 ng of input DNA were used to build the libraries according to manufacturer's protocol. The pool was finally sequenced on a NovaSeq 6000 (Illumina) S2x150 bp flow cell.

Reads mapping: In the first analysis part, reads were mapped using BWA mem software (v0.7.15) on the Human reference genome (hg19 assembly) using default parameters. As a second quality control, statistics regarding the mapping (percentage of aligned reads total and falling into the capture, percentage of PCR duplicates) and the capture coverage were produced using a combination of SAMtools, flagstat, BEDtools coverage and PicardTools MarkDuplicates.

Variant calling: Variant calling of both single nucleotide variations (SNVs) and small insertion/deletions (indels) was then performed on the processed alignment files using a combination of the SAMtools mpileup⁴³ and *VarScan2* *mpileup2cns* (v2.4.3)⁴⁴.

Annotations: Annotations from several databases (RefSeq, dbsnp v150, COSMIC v86, 1000g project 08/2015 version, ESP6500, gnomAD [all and ethnies], ICGC v21, and dbnsfp v35 predictions) were provided by ANNOVAR to annotate small variants⁴⁵. Only the RefSeq database was used for intermediate-indel. During this step, all variants present in -10/+10 bp of each exon junction were defined as splicing.

Coverage quality control: A more detailed notion of each gene percentage, per barcode, covered by at least 100X, in the processed alignments, was also provided using a combination of awk, SAMtools mpileup, BEDtools intersect, multiinter and merge. Bases covered by less than 100X were reported per barcode using the same strategy. Genes belonging to patient pathology were tagged in these two files to facilitate the search for genes of interest that might be badly covered.

Variant selection algorithm: Stringent selection algorithm was applied to remove a maximum of irrelevant variants. We considered a minimal allelic ratio of 5% and a maximal frequency in the population of 0.1%. Only truncating mutations (frameshift deletion and insertion, stopgain, splicing alteration and hotspot mutations from Cancer Hotspot database) with a minimal coverage of 200 reads were retained for tumor suppressor gene variants. All missense variants known to be hotspot mutations from Cancer Hotspot database and no minimal coverage were retained for oncogenes variants⁴⁶. For genes classified as both oncogenes and TSG (such as *NOTCH1*) or with known missense hotspots (like *TP53*), truncating mutations with a minimal coverage of 200, and known hotspots mutations with no minimal coverage were selected.

Oncoprints: Oncoprints were drawn using the ComplexHeatmap package and were performed with the Maftools package for 4.00 version of R.

Targeted NGS on plasma

NGS-based ctDNA analysis was performed by using an amplicon-based targeted sequencing test (named OncoFOLLOW™). Somatic variants identified in tumor tissues by targeted NGS were prioritised to build a patient-specific panel, which included a median of 14 variants (IQR, 13-16 variants). This custom panel was combined with a fixed core panel of 40 genes, covering a list of frequently mutated tumor suppressor genes and oncogenes in HNSCC (**Supplementary Table 1**).

ctDNA protocol: Tumor DNA was extracted from plasma using the QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (ref. Qiagen #937556), according to the manufacturer's instructions. Amplicon-based method was applied for library preparation with the AmpliSeq™ technique. Briefly, this technique can detect single nucleotide variations, indels and gene fusions with a limit of detection up to 0.1%. This method consists of an amplification step using a single pool of oligonucleotide primer pairs, with each pair designed to amplify a specific genomic region. The error rate is very low thanks to the unique molecular tags linked to gene-specific primers, that allow to eliminate the errors generated during the library preparation and the sequencing process. The library was finally sequenced on Ion Torrent S5 XL.

VAF estimation: ctDNA profiling required the detection of ctDNA in one blood sample as criteria for positive. ctDNA VAF was calculated as the proportion of ctDNA harboring the variant in a background of wild-type ctDNA at a specific location on the genome. In positive blood samples, the tumor fraction was estimated from the detected mutation with the highest VAF (e.g., the dominant clone allele frequency).

Statistical analyses

This report was written in accordance with REMARK criteria⁴⁷. Calculations were performed using R statistical software v4.2.2 (VennDiagram, binom, lubridate, prodlim, rstatix, stats, epiR, survival, swimplot and tidyverse packages; R Foundation). This observational study had not prespecified power.

Study objectives were to assess (i) the feasibility of a dedicated targeted NGS approach for ctDNA detection and monitoring, (ii) the potential of ctDNA as a biomarker of tumor heterogeneity, and (iii) the clinical validity of ctDNA-based MRD in early-stage HNSCC patients. Endpoints included the sensitivity of the dedicated ctDNA assay-panel for ctDNA detection at surgery, in postoperative blood samples and at recurrence; the concordance rates of mutations between tumor tissues and ctDNA at surgery and at recurrence; the lead-time defined as the time interval (in months) between the first ctDNA-positive postoperative blood sample and clinically confirmed recurrence; RFS in MRD-positive and MRD-negative patients as assessed by using Kaplan-Meier methods and Cox proportional hazard regression models. MRD was defined by the presence of ctDNA in postoperative blood samples that typically preceded clinical relapse by several months.

Comparisons between groups were assessed by using the 2-tailed, unpaired *t* test for quantitative variables and the Fisher or χ^2 test for qualitative variables. Exact binomial confidence limits were calculated for test sensitivity, specificity, and positive and negative predictive value. Survival curves were obtained with Kaplan-Meier estimates and compared using the log-rank test. RFS was defined as the time elapsed between the date of inclusion and the date of cancer recurrence or last follow-up. OS was defined as the time elapsed between the date of inclusion and death from any cause or last follow-up. Multivariable Cox regression analyses were used to test the independent prognostic value of ctDNA detection, adjusted for age, sex, tumor size, nodal involvement and HPV status. These variables were pre-selected as known prognostic factors. In addition, multivariable prognostic models were stratified by

adjuvant treatment modality (adjuvant [chemo]radiotherapy vs no adjuvant treatment). The proportional hazards assumption was confirmed for each model constructed.

All p values were 2-sided, and the level of significance was set at $p < 0.05$.

Data availability

Original files and raw data files from the SCANDARE study will be made available from the corresponding authors upon reasonable request. The data are not publicly available due to information that could compromise the privacy of the research participants. All processed data used for the analyses are available in the **Supplementary Materials**.

Code availability

Source codes are given in **Supplementary Software**.

Figure legends

Figure 1 Consort diagram

FFPE, frozen and formalin fixed and paraffin embedded; TMB, tumor mutational burden; NGS, next generation sequencing; ctDNA, circulating tumor DNA

Figure 2 Venn diagram depicting both shared and exclusive mutations in tumor tissue and serial ctDNA-positive blood samples

Figure 3 Overview of mutational landscapes inferred from targeted sequencing on tumor tissue (A), and serial blood samples obtained at surgery (B) and at recurrence (C)

Figure 4 Oncoprint summarizing the 20 most frequently mutated genes in tumor tissue and ctDNA-positive blood samples obtained at surgery from 41 patients. Mutated genes involved in spatial intra-tumor heterogeneity are also shown. Each column represents a tumor tissue or a blood sample. Each sample is designated with a patient's SCANDARE identification number. TMB, tumor mutational burden; HPV, human papillomavirus

Figure 5 Oncoprint summarizing the 20 most frequently mutated genes in tumor tissue and serial ctDNA-positive blood samples from 41 patients. Mutated genes involved in spatiotemporal tumor heterogeneity are also shown. Each column represents a tumor tissue or a blood sample obtained at surgery ("baseline"), within 14 weeks after surgery ("post-op"), at six months and at recurrence. Each sample is designated with a patient's SCANDARE identification number.

TMB, tumor mutational burden; HPV, human papillomavirus

Figure 6 Interval-censored follow-up time plots annotated for longitudinal ctDNA profiling and clinical events in 41 patients. Patients are grouped according to adjuvant treatment modality.

VAF, variant allele frequency; ctDNA, circulating tumor DNA

Figure 7 Kaplan-Meier survival curves showing recurrence-free survival stratified by ctDNA detection status at surgery (A), within 14 weeks after surgery (B), and at six months (C)

ctDNA, circulating tumor DNA; HR, hazard ratio

Figure 8 Kaplan-Meier survival curves showing overall survival stratified by ctDNA detection status at surgery (A), within 14 weeks after surgery (B), at six months (C), and at recurrence (D)

ctDNA, circulating tumor DNA; HR, hazard ratio

Figure 9 Multivariable prognostic models of recurrence free survival (A) and overall survival (B). Multivariable models were generated for patients with early-stage head and neck tumors treated with upfront curative-intent surgery. The HR and 95% CI are based on Cox proportional hazards regression models with known prognostic factors plus ctDNA-based MRD status within 14 weeks after surgery as explanatory covariates.

HPV, human papillomavirus; MRD, minimal residual disease; HR, hazard ratio; AIC, Akaike Information Criterion

Supplementary figure legends

Supplementary Figure 1 Oncoprint summarizing the 50 most frequently mutated genes in tumor tissue and ctDNA-positive blood samples obtained at surgery from 41 patients. Each column represents a tumor tissue or a blood sample. Each sample is designated with a patient's SCANDARE identification number.

TMB, tumor mutational burden

Supplementary Figure 2 Oncoprint summarizing the 50 most frequently mutated genes in tumor tissue and serial ctDNA-positive blood samples from 41 patients. Each column represents a tumor tissue or a blood sample obtained at surgery ("baseline"), within 14 weeks after surgery ("post-op"), at six months and at recurrence. Each sample is designated with a patient's SCANDARE identification number.

TMB, tumor mutational burden

Abbreviations

AIC, Akaike Information Criterion; BS Blood Sample; CHIP Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential; CI Confidence Interval; ctDNA Circulating Tumor DNA; DRAGON Detection of Relevant Alterations in Genes involved in Oncogenetics; FFPE Frozen and Formalin Fixed and Paraffin Embedded; HPV Human Papillomavirus; HR Hazard Ratio; HNSCC Head and neck squamous cell carcinoma; IQR Interquartile Range; MRD Minimal Residual Disease; NGS Next Generation Sequencing; OS Overall Survival; RFS Recurrence-Free Survival; TMB Tumor Mutational Burden; VAF Variant Allele Frequency;

Acknowledgments and funding

We would like to acknowledge the patients, their families, and the multidisciplinary and continuously growing SCANDARE Team: Guillaume Rougier, Pauline Nicol, Manuel Erminy, Christian Chappey, Caroline Hoffmann, Enora Laas, Jean-Guillaume Féron, Virginie Fourchette, Grégoire Mialhe, Louise Maumy, Elodie Gauroy, Léa Pauly, Claire Bonneau, Eugénie Guillot, Thomas Gaillard, Houssein El Hajj, Nathalie Guénard, Pauline Malou, Nesrine Boutoula, Audrey Faye, Tiphaine Batteux, Amel Ayache, Sylvie Jovelin, Céline Meudre, Cloé Pierson, Philemon Sirven, Sylvain Baulande, Patricia Legoix, Virginie Raynal, Philippe Hupé, Apolline Gallois, Xavier Paoletti, Sergio Roman Roman, Eliane Piaggio, Edith Borcoman, Christine Sedlik, Jeremie Goldstein, Jordan Denizeau, Géraldine Gentric, Christian Daveaux, Giulia Vanoni, Céline Vallot, Juliette Bertorello, Eleonora Timperi, Rhana Mhaidly, Camille Landragin, Justine Marsolier, Sylvia Lopez-Lastra, Linda Larbi Chérif, Charlotte Lecerf, Anne-Sophie Hamy-Petit, Rémi Goudefroye, and Mégane Bouvet.

SCANDARE is supported by the grant ANR-10-EQPX-03 and ANR10-INBS-09-08 from the Agence Nationale de la Recherche and by the Cancéropôle Ile-de-France.

Conflicts of interest

C. Le Tourneau: Roche, Seattle Genetics, Rakuten, Nanobiotix, MSD, BMS, Merck Serono, AstraZeneca, GlaxoSmithKline, Novartis, Celgene, Exscientia, ALX Oncology, Seattle Genetics.

M. Kamal: Roche, AstraZeneca.

References

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394–424 (2018).
2. Leeman, J. E. *et al.* Patterns of Treatment Failure and Postrecurrence Outcomes Among Patients With Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma After Chemoradiotherapy Using Modern Radiation Techniques. *JAMA Oncol* **3**, 1487–1494 (2017).
3. Chow, L. Q. M. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* **382**, 60–72 (2020).
4. Caudell, J. J. *et al.* NCCN Guidelines® Insights: Head and Neck Cancers, Version 1.2022. *J Natl Compr Canc Netw* **20**, 224–234 (2022).
5. Ang, K. K. *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 24–35 (2010).
6. Leemans, C. R., Snijders, P. J. F. & Brakenhoff, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 269–282 (2018).
7. Mroz, E. A. *et al.* Intra-tumor genetic heterogeneity and mortality in head and neck cancer: analysis of data from the Cancer Genome Atlas. *PLoS Med.* **12**, e1001786 (2015).
8. Schrank, T. P. *et al.* Genomic heterogeneity and copy number variant burden are associated with poor recurrence-free survival and 11q loss in human papillomavirus-positive squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer* **127**, 2788–2800 (2021).
9. Bernier, J. *et al.* Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck* **27**, 843–850 (2005).
10. Gatta, G. *et al.* Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EURO CARE-5 population-based study. *Eur J Cancer* **51**, 2130–2143 (2015).
11. Jahr, S. *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and

evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* **61**, 1659–1665 (2001).

12. Stroun, M. *et al.* Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* **46**, 318–322 (1989).

13. van Ginkel, J. H., Huibers, M. M. H., van Es, R. J. J., de Bree, R. & Willems, S. M. Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of head and neck cancer patients. *BMC Cancer* **17**, 428 (2017).

14. Jonas, H. *et al.* Early relapse detection by monitoring of circulating cell-free DNA in patients with localized head and neck squamous cell carcinoma: A subgroup analysis of the multicenter randomized clinical trial IMSTAR-HN. *Oral Oncol* **126**, 105733 (2022).

15. Flach, S. *et al.* Liquid BIOPsy for MiNimal RESidual DiSease Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (LIONESS)-a personalised circulating tumour DNA analysis in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **126**, 1186–1195 (2022).

16. Egyud, M. *et al.* Plasma circulating tumor DNA as a potential tool for disease monitoring in head and neck cancer. *Head Neck* **41**, 1351–1358 (2019).

17. Kogo, R. *et al.* Individualized circulating tumor DNA monitoring in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med* **11**, 3960–3968 (2022).

18. Soulières, D. *et al.* Molecular Alterations and Buparlisib Efficacy in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Biomarker Analysis from BERIL-1. *Clin. Cancer Res.* **24**, 2505–2516 (2018).

19. Galot, R. *et al.* Liquid biopsy for mutational profiling of locoregional recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **104**, 104631 (2020).

20. Braig, F. *et al.* Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, 42988–42995 (2016).

21. Johnson, F. M. *et al.* Inhibition of the Phosphatidylinositol-3 Kinase Pathway Using

Bimiralisib in Loss-of-Function NOTCH1-Mutant Head and Neck Cancer. *Oncologist* **27**, 1004-e926 (2022).

22. Chakravarty, D. *et al.* OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol* **2017**, PO.17.00011 (2017).

23. Wan, J. C. M. *et al.* ctDNA monitoring using patient-specific sequencing and integration of variant reads. *Sci Transl Med* **12**, eaaz8084 (2020).

24. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**, 576–582 (2015).

25. Ho, A. L. *et al.* Tipifarnib in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma With HRAS Mutations. *J Clin Oncol* **39**, 1856–1864 (2021).

26. Perrone, F. *et al.* TP53 mutations and pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin and fluorouracil chemotherapy in resected oral cavity squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **28**, 761–766 (2010).

27. Osman, A. A. *et al.* Evolutionary Action Score of TP53 Coding Variants Is Predictive of Platinum Response in Head and Neck Cancer Patients. *Cancer Res.* **75**, 1205–1215 (2015).

28. Morris, L. G. T. *et al.* The Molecular Landscape of Recurrent and Metastatic Head and Neck Cancers: Insights From a Precision Oncology Sequencing Platform. *JAMA Oncol* **3**, 244–255 (2017).

29. Economopoulou, P. *et al.* Next-generation sequencing (NGS) profiling of matched tumor and circulating tumor DNA (ctDNA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Oral Oncol* **139**, 106358 (2023).

30. Wang, Y. *et al.* Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med* **7**, 293ra104 (2015).

31. Alcaide, M. *et al.* Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR. *Sci Rep* **10**, 12564 (2020).

32. Hanna, G. J. *et al.* Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer. *Ann Oncol* **29**, 1980–1986 (2018).
33. Fakhry, C. *et al.* Association of Oral Human Papillomavirus DNA Persistence With Cancer Progression After Primary Treatment for Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Oncol* **5**, 985–992 (2019).
34. Akashi, K. *et al.* Usefulness of circulating tumor DNA by targeting human papilloma virus-derived sequences as a biomarker in p16-positive oropharyngeal cancer. *Sci Rep* **12**, 572 (2022).
35. Chera, B. S. *et al.* Plasma Circulating Tumor HPV DNA for the Surveillance of Cancer Recurrence in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *J Clin Oncol* **38**, 1050–1058 (2020).
36. Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov* **11**, 858–873 (2021).
37. Turner, N. C. *et al.* Results of the c-TRAK TN trial: a clinical trial utilising ctDNA mutation tracking to detect molecular residual disease and trigger intervention in patients with moderate- and high-risk early-stage triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* **34**, 200–211 (2023).
38. Stetson, D. *et al.* Orthogonal Comparison of Four Plasma NGS Tests With Tumor Suggests Technical Factors are a Major Source of Assay Discordance. *JCO Precis Oncol* **3**, 1–9 (2019).
39. Coombs, C. C. *et al.* Therapy-Related Clonal Hematopoiesis in Patients with Non-hematologic Cancers Is Common and Associated with Adverse Clinical Outcomes. *Cell Stem Cell* **21**, 374–382.e4 (2017).
40. Hu, Y. *et al.* False-Positive Plasma Genotyping Due to Clonal Hematopoiesis. *Clin Cancer Res* **24**, 4437–4443 (2018).
41. Desai, P. *et al.* Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before

diagnosis. *Nat Med* **24**, 1015–1023 (2018).

42. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* **6**, p11 (2013).

43. Chakravarty, D. *et al.* OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol* **2017**, (2017).

44. Koboldt, D. C. *et al.* VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* **25**, 2283–2285 (2009).

45. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* **38**, e164 (2010).

46. Chang, M. T. *et al.* Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat Biotechnol* **34**, 155–163 (2016).

47. McShane, L. M. *et al.* REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer* **93**, 387–391 (2005).

Table 1. Baseline patient characteristics according to recurrence status

n (%)	Recurrent patients (<i>n</i> = 31)	Non- recurrent patients (<i>n</i> = 10)	Total (<i>n</i> = 41)	<i>p</i> - value¶
Age, years				1
Median (IQR)	66 (57-75)	63 (58-79)	65 (58-75)	
Sex, n (%)				1
Male	25 (81%)	8 (80%)	33 (80%)	
Female	6 (19%)	2 (20%)	8 (20%)	
Smoker, n (%)				0.3
Current/Former	15 (48%)	7 (70%)	22 (54%)	
Never	16 (52%)	3 (30%)	19 (46%)	
Alcohol consumption, n (%)				1
Current/Former	15 (48%)	5 (50%)	20 (49%)	
Never	16 (52%)	5 (50%)	21 (51%)	
Tumor location, n (%)				0.07
Oral cavity	12 (39%)	8 (80%)	20 (49%)	
Oropharynx	15 (48%)	1 (10%)	16 (39%)	
Larynx	3 (10%)	0	3 (7%)	
Hypopharynx	1 (3%)	1 (10%)	2 (5%)	
Grading, n (%)				1
Well/Moderately differentiated	27 (87%)	9 (90%)	36 (88%)	
Poorly/Undifferentiated	4 (13%)	1 (10%)	5 (12%)	
HPV status, n (%)				1
HPV negative	23 (74%)	7 (70%)	30 (73%)	
HPV positive	8 (26%)	3 (30%)	11 (27%)	
T classification, n (%)				0.5
T1/T2	16 (52%)	7 (70%)	23 (56%)	
T3/T4	15 (48%)	3 (30%)	18 (44%)	
Lymph node involvement, n (%)				0.5
Negative	13 (42%)	6 (60%)	19 (46%)	
Positive	18 (58%)	4 (40%)	22 (54%)	
Adjuvant therapy, n (%)				0.6
None	11 (35%)	2 (20%)	13 (32%)	
Radiotherapy alone	13 (42%)	3 (30%)	16 (39%)	
Chemoradiation	7 (23%)	5 (50%)	12 (29%)	

¶Tests for differences between recurrent and non-recurrent patients
Abbreviations: *IQR* interquartile range, *HPV* human papillomavirus

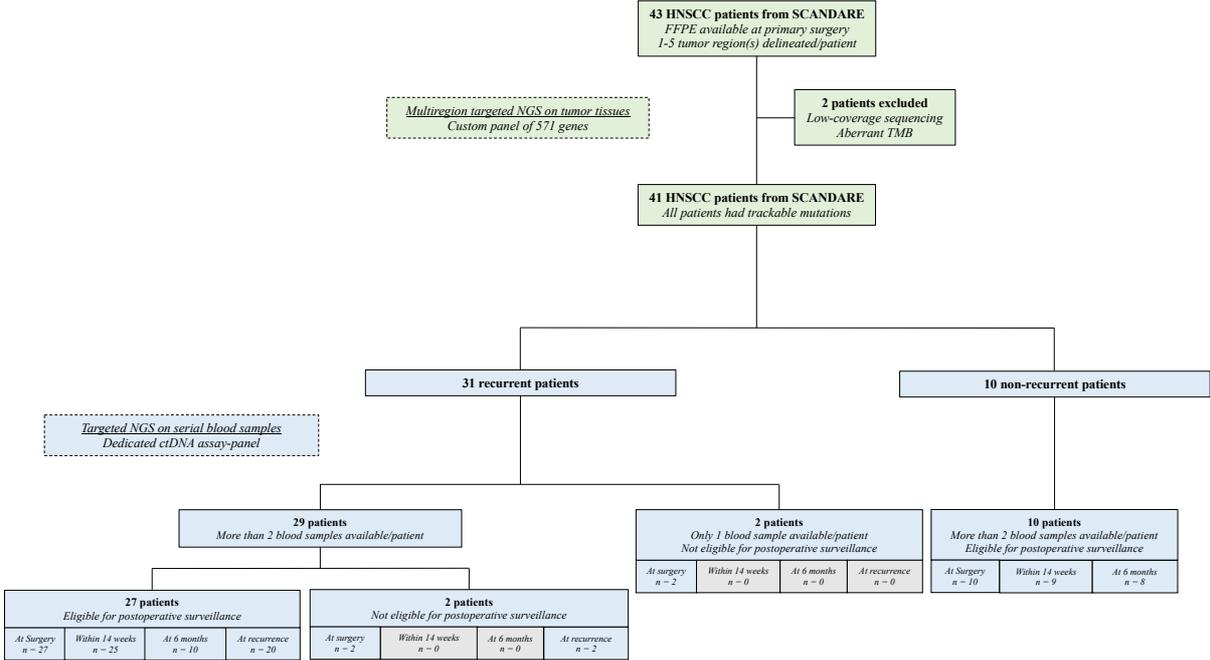


Figure 1

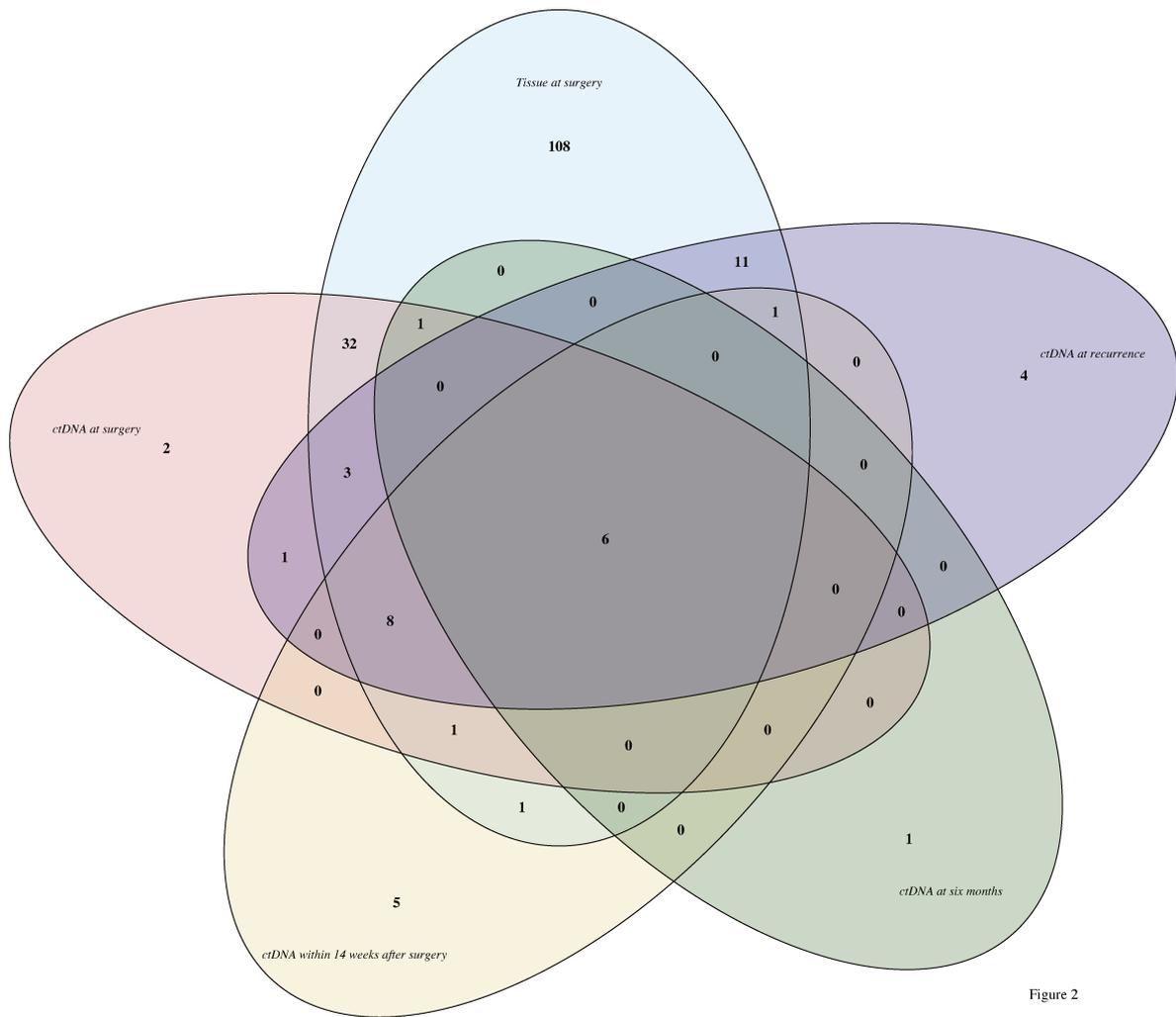


Figure 2

ctDNA in early stage HNSCC

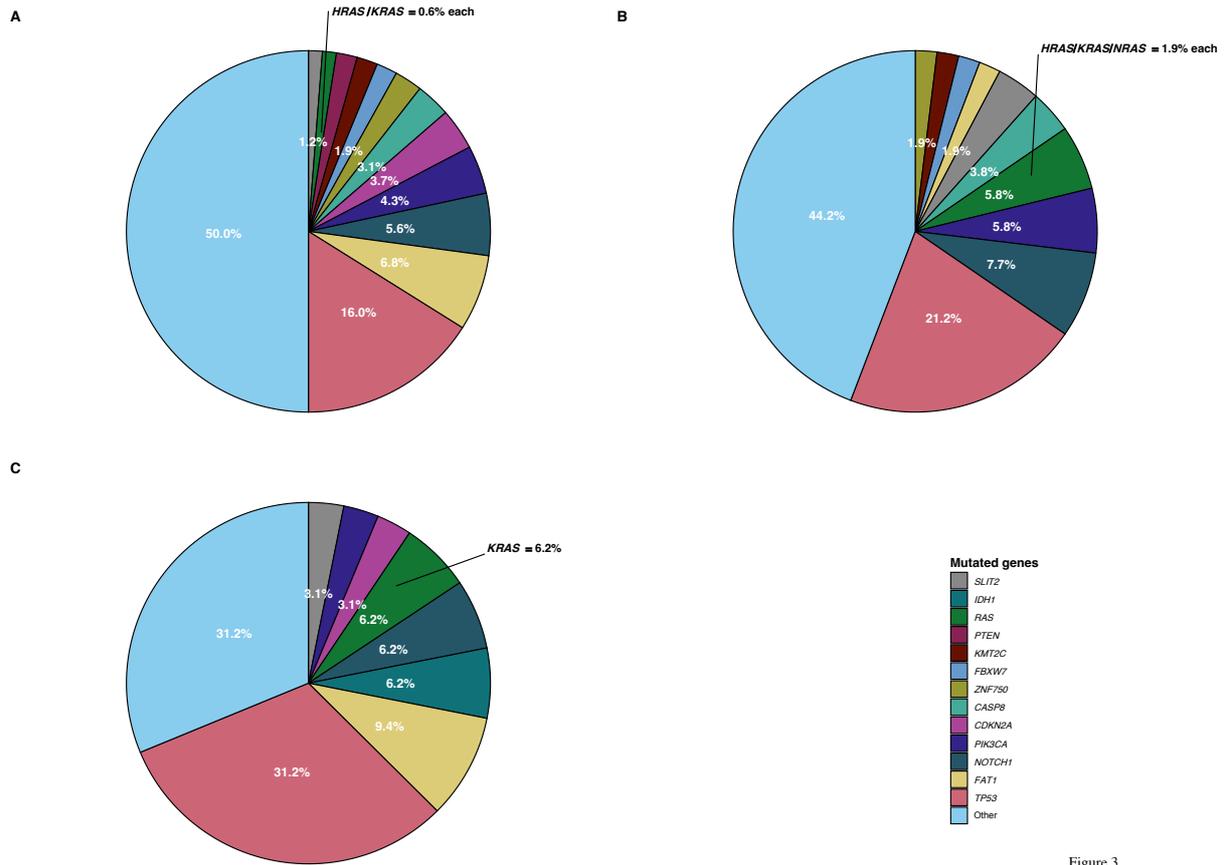


Figure 3

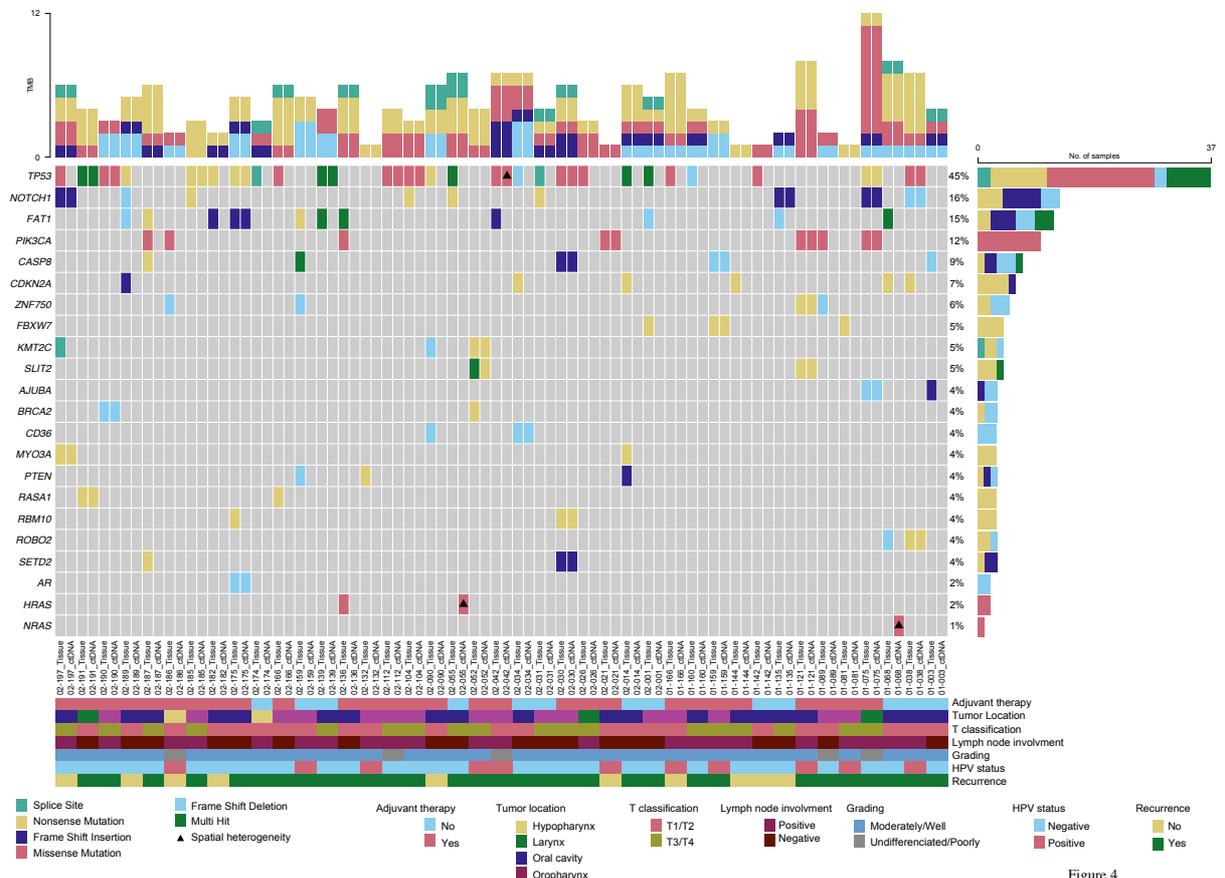


Figure 4

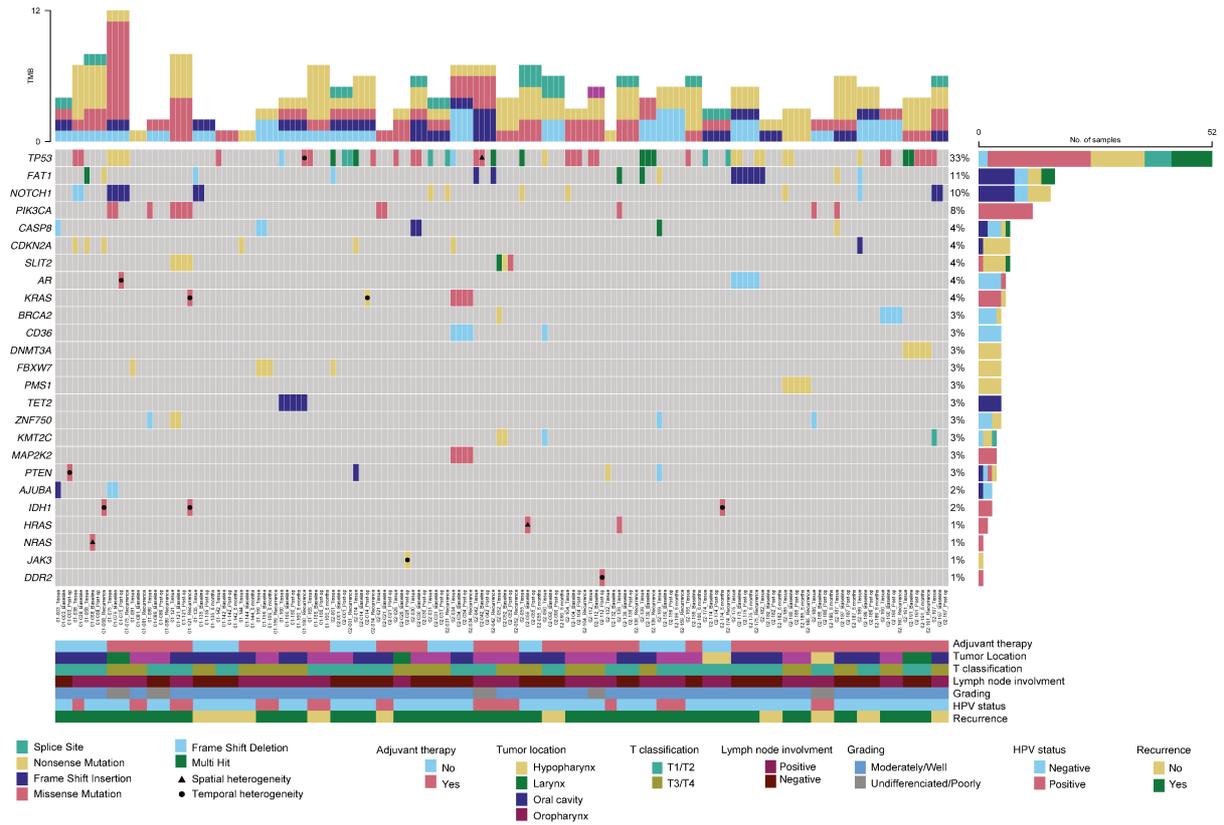


Figure 5

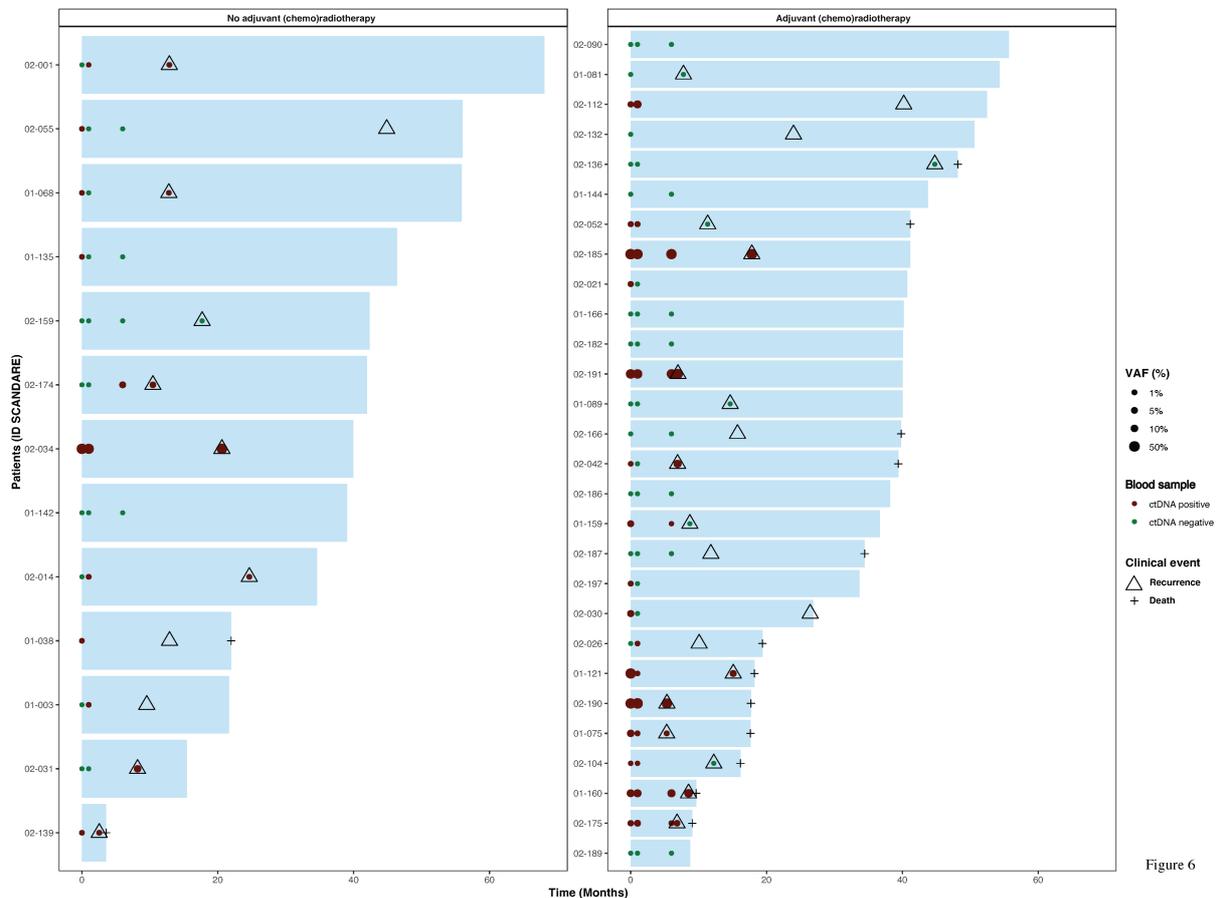


Figure 6

ctDNA in early stage HNSCC

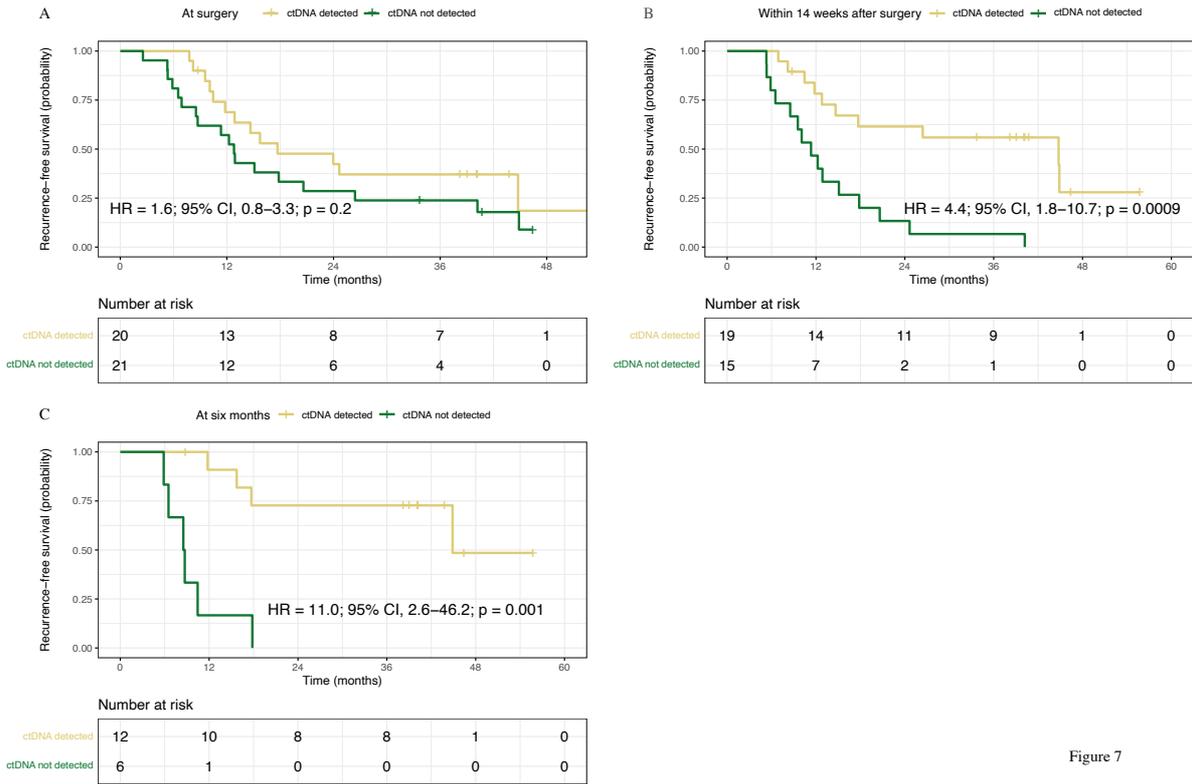


Figure 7

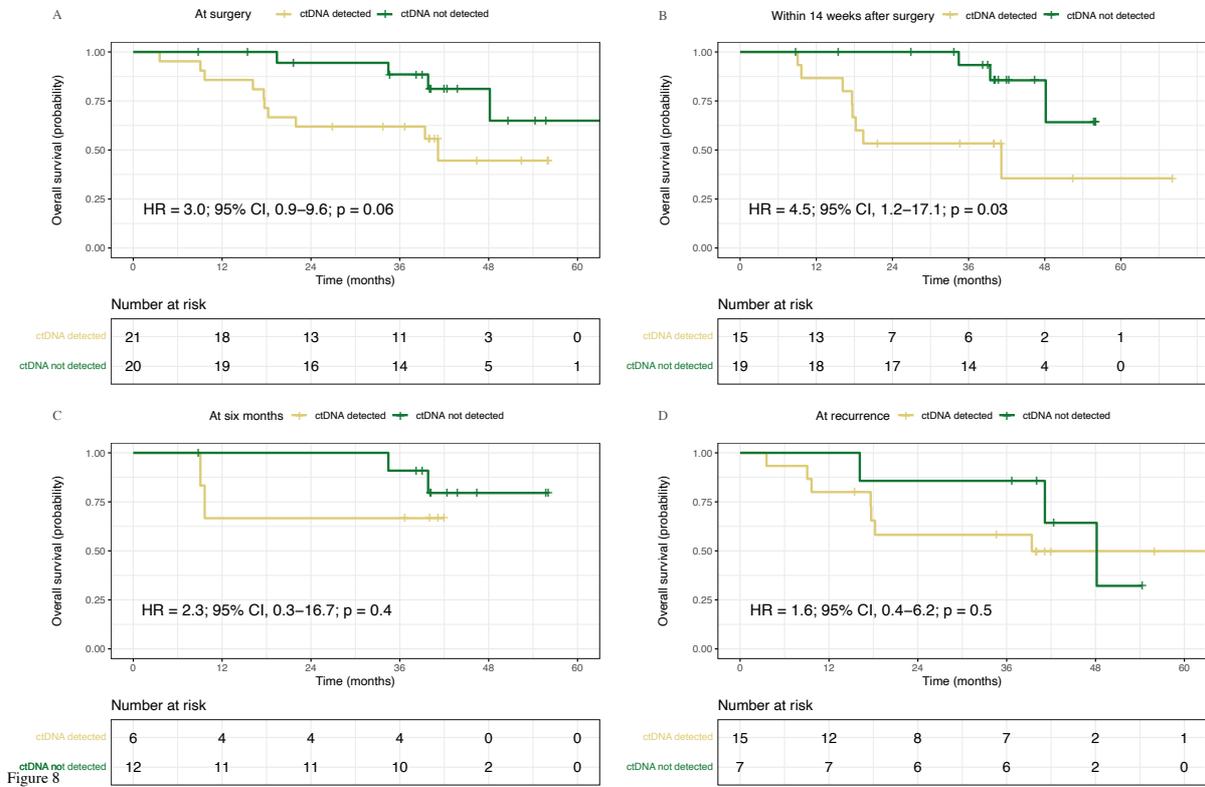


Figure 8

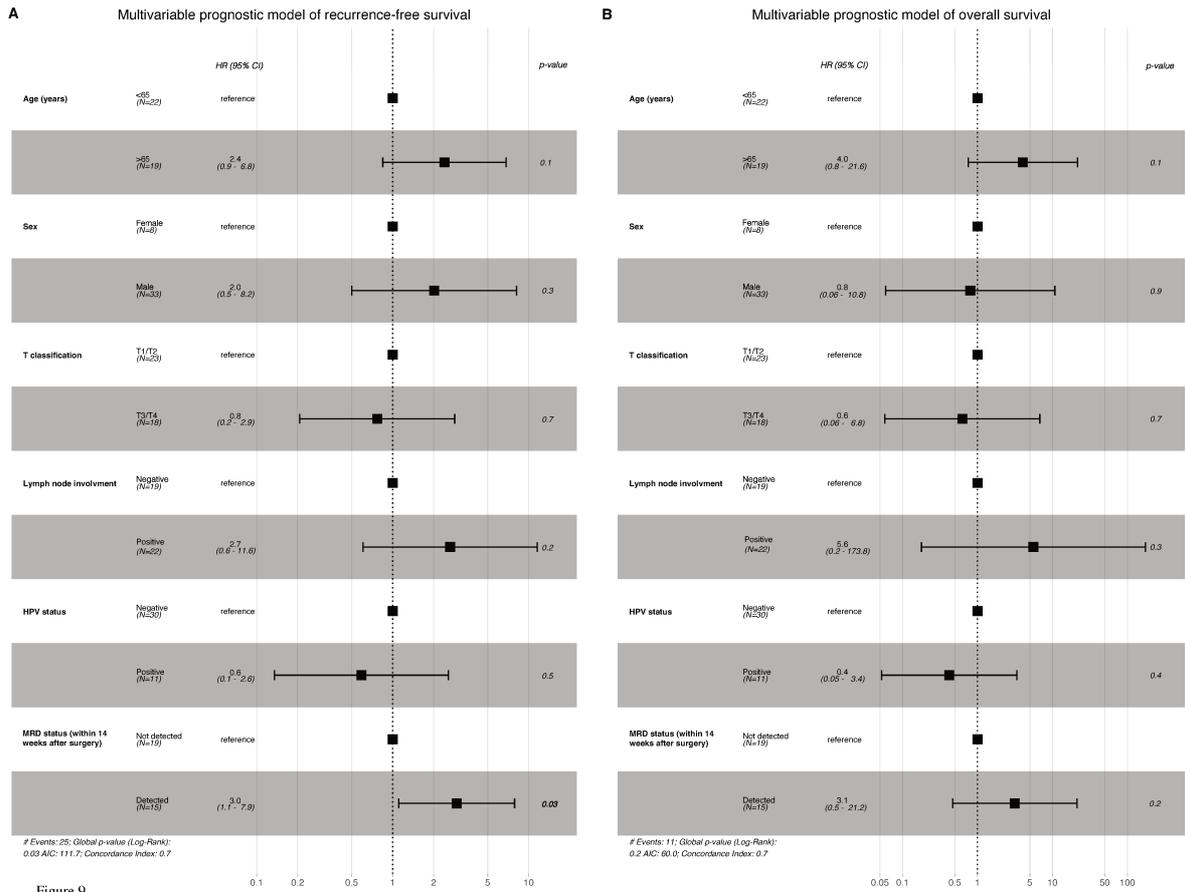
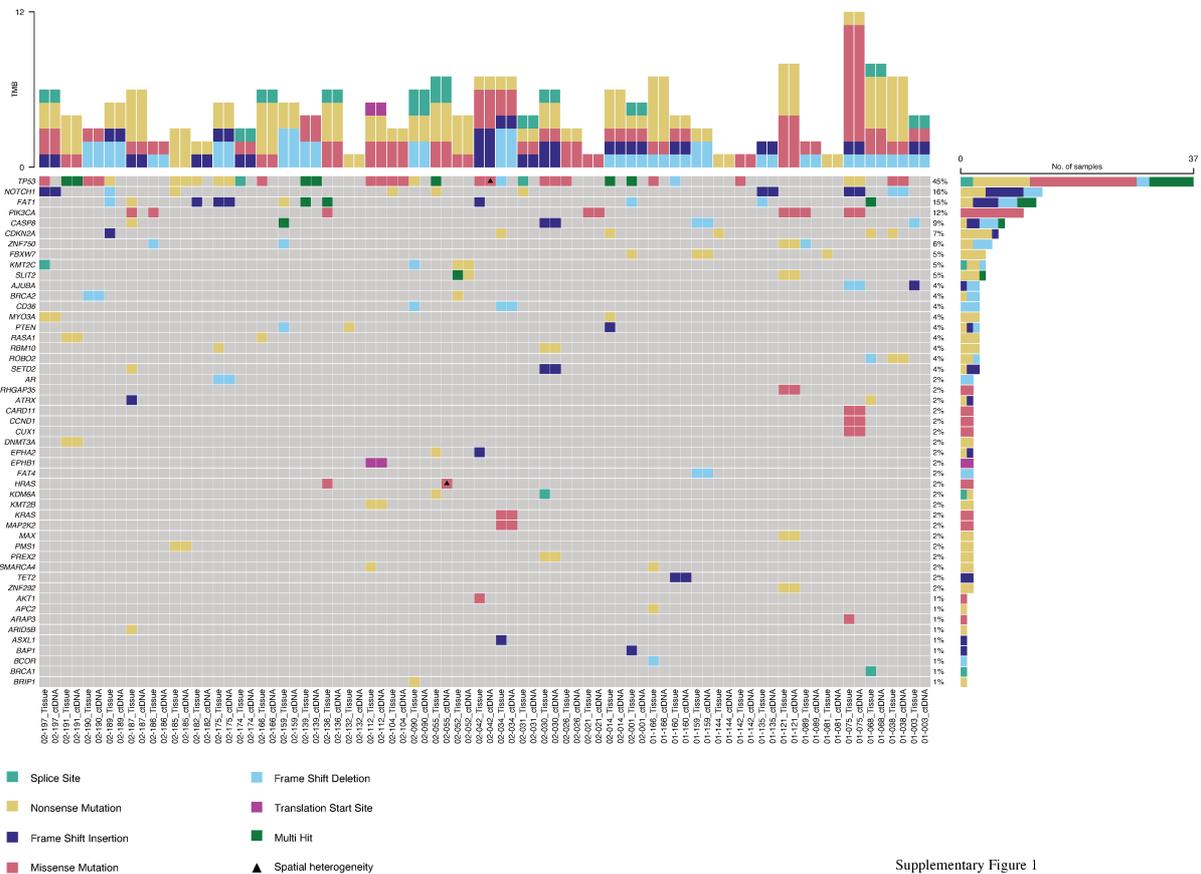
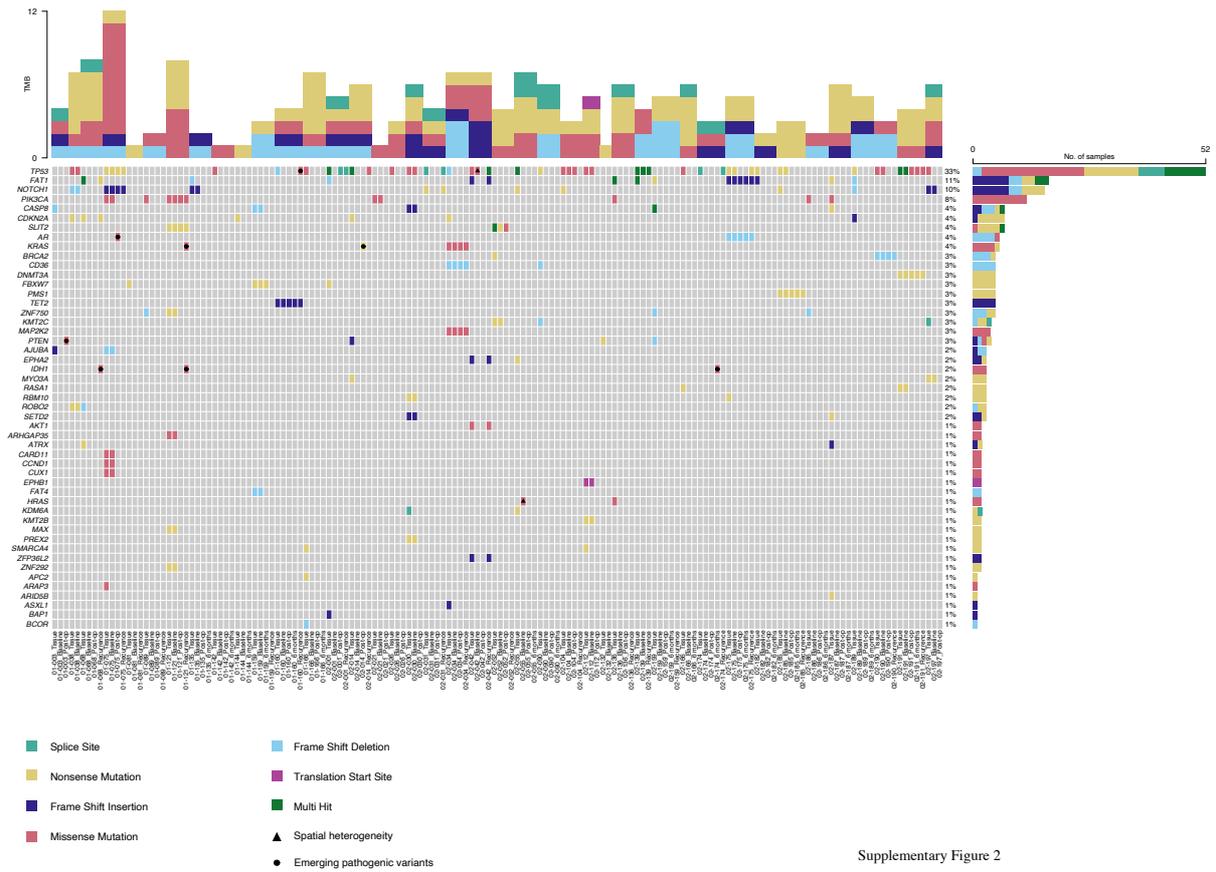


Figure 9



ctDNA in early stage HNSCC



Supplementary Figure 2

3.2.3 Discussion

Nos travaux ont porté sur 41 patients atteints de CETC localisés et opérés à visée curative dans SCANDARE. Pour chaque patient, des mutations traçables étaient identifiées dans les pièces de résection et des prélèvements sanguins sériés étaient collectés au moment de l'exérèse chirurgicale de la tumeur primitive, dans les 14 semaines suivant la chirurgie, à six mois et à la date de récurrence. Nous avons validé la faisabilité d'une approche de séquençage ciblé pour la détection et le *monitoring* des ctDNA testés à ces différents *timepoints*.

Les taux de détection des ctDNA s'échelonnaient de 51% au moment de l'exérèse chirurgicale à 68% à la récurrence. Les variants étaient détectables dans le plasma jusqu'au seuil de fréquence allélique de 0.1% rendant possible un *monitoring* postopératoire pour vérifier l'absence de ctDNA (qui signe une résection complète) et la détection d'une maladie résiduelle minimale.

Notre approche a permis de mettre en évidence une hétérogénéité intra-tumorale spatiale et temporelle chez respectivement 14% et 43% des patients séquencés. Le panorama moléculaire capturé par le ctDNA à chirurgie était similaire à celui obtenu par le séquençage des pièces opératoires et dominé par des mutations de *TP53* (16% vs 21%), *NOTCH1* (6% vs 8%) et *PIK3CA* (4% vs 6%). Le séquençage du ctDNA à récurrence a également montré une évolution du panorama moléculaire avec une plus grande prévalence de mutations *TP53* (31%), *FAT1* (9%), *NOTCH1* (6%) et *RAS* (6%).

La plupart des mutations détectées dans le ctDNA à chirurgie (dont des mutations actionnables de *NRAS* et *HRAS*) étaient absentes des prélèvements tissulaires appariés indiquant une hétérogénéité spatiale. L'émergence de nouvelles mutations détectées dans les prélèvements sanguins postopératoires et à récurrence (dont des mutations actionnables de *KRAS* et *PTEN*) indiquait, quant à elle, une hétérogénéité temporelle. Le séquençage des ctDNA sériés permettait d'appréhender les mutations de l'ensemble de la tumeur, leur évolution et leur émergence au cours du temps soulignant un intérêt potentiel pour la médecine de précision en complément du séquençage des biopsies solides.

Dans le *setting* postopératoire, la détection d'une maladie résiduelle minimale permettait d'anticiper de 10 mois une récurrence cliniquement patente chez 63% des patients. Sa détection dans les 14 semaines de l'exérèse de la tumeur primitive était significativement associée à une augmentation du risque de récurrence après ajustement sur les variables pronostiques usuelles (HR = 3.0 ; $p = 0.003$). Ces résultats ont permis de démontrer la validité clinique d'un *monitoring* de la maladie résiduelle minimale basée sur la détection du ctDNA. Des essais cliniques interventionnels sont nécessaires pour évaluer son utilité clinique.

3.2.4 Perspectives et publications

Les résultats préliminaires obtenus pour les travaux sur l'hétérogénéité temporelle appréhendée par l'analyse du ctDNA ont été présentés au congrès annuel de l'AACR 2023 en session poster. Ce poster a fait l'objet d'un prix *Scholar-in-Training Award* décerné par la Fondation AACR Margaret Foti d'un montant de 1800 \$. Le poster *Spatial and longitudinal tumor heterogeneity in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with primary surgery* est disponible en Annexe 4.1.3.

Les résultats obtenus pour les travaux sur la caractérisation pronostique du ctDNA seront présentés au congrès annuel de l'ESMO 2023 en session poster. L'abstract *Serial cell-free tumor DNA in prognosing survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma treated with upfront surgery* est disponible en Annexe 4.1.5.

Le manuscrit est en cours de relecture par les co-auteurs et sera soumis à *Nature Communications* à l'hiver 2023.

3.3 Résultats sur l'hétérogénéité intra-tumorale temporelle sous afatinib

3.3.1 Introduction

Les sous-clones qui composent une tumeur génèrent une diversité d'altérations *drivers*, de voies de résistance primaire et de potentiels d'adaptation qui sont autant d'obstacles au déploiement d'une médecine de précision¹⁶. Les choix thérapeutiques guidés par l'analyse d'une seule biopsie ne prennent pas en compte l'hétérogénéité qui existe dans une tumeur primitive, entre une tumeur primitive et ses métastases et entre les métastases⁷. La sélection de sous-clones résistants sous la pression thérapeutique conduit inévitablement à un échappement tumoral dans les quelques mois qui suivent l'initiation d'une thérapie ciblée comme cela a été rapporté dans les CETC traités par inhibiteurs d'EGFR^{200,202,204,208}.

La plupart des thérapies ciblées innovantes et des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire sont testés chez des patients atteints de CETC en situation de récurrence et/ou métastatique déjà lourdement prétraités²⁸⁹⁻²⁹³. Ce contexte clinique interfère avec l'évaluation d'un bénéfice thérapeutique et la recherche de biomarqueurs potentiels théranostiques²⁹⁴. En exploitant le délai préopératoire incompressible dans la prise en charge des cancers localisés et opérables,

les essais de fenêtre d'opportunité permettent de tester de nouveaux médicaments chez des patients non prétraités en utilisant les prélèvements tissulaires disponibles au diagnostic et à l'issue du traitement. Contrairement aux essais néoadjuvants bâtis sur l'efficacité d'un traitement expérimental, les essais de fenêtre d'opportunité cherchent plutôt à en caractériser les biomarqueurs prédictifs d'efficacité et/ou pharmacodynamiques.

Les inhibiteurs de tyrosine kinase pan-HER dirigés contre les homo et les hétérodimères de récepteurs EGFR permettent de surmonter les mécanismes de résistance secondaire qui apparaissent sous cetuximab liés au contournement de la voie EGFR par l'activation de voies alternatives²⁰⁵. L'afatinib est un inhibiteur irréversible de tyrosine kinase pan-HER de deuxième génération dirigé contre le domaine catalytique d'EGFR, HER2 et HER4. L'afatinib inhibe également la transphosphorylation d'HER3^{295,296}.

Un essai de phase II randomisé (LUX-Head and Neck 1) comparant l'afatinib au méthotrexate dans des CETC en deuxième ligne métastatique a montré une supériorité de l'afatinib en termes de survie sans progression (2.6 mois vs 1.7 mois respectivement) sans traduction en termes de survie globale²⁰⁸. Les analyses translationnelles ont permis d'identifier des sous-groupes de CETC p16 négatifs, HER3 faibles, PTEN forts (en immunohistochimie) et EGFR amplifiés (en hybridation *in situ* fluorescente) de meilleurs pronostics sous afatinib bien que le gain en survie sans progression reste marginal (inférieur à 1.5 mois pour tous les sous-groupes)²⁰⁹.

Un essai de fenêtre d'opportunité conduit sous l'égide de l'EORTC a testé deux semaines de traitement par afatinib chez des patients atteints de CETC localisés et non prétraités dans l'attente d'un geste opératoire à visée curative²¹⁰. Malgré la brièveté du traitement, les taux de réponses partielles métaboliques et radiologiques atteignaient respectivement 70% et 22% sans signal de toxicité préopératoire. Les biomarqueurs prédictifs d'efficacité rapportés dans les analyses translationnelles de LUX-Head and Neck 1 n'ont pas été confirmés dans cette étude.

Dans le cadre de ma thèse de sciences, nous avons cherché à appréhender une hétérogénéité intra-tumorale temporelle des CETC sous thérapie ciblée en tirant parti des analyses translationnelles réalisées dans l'essai de fenêtre d'opportunité GEP11 PREDICTOR (<https://clinicaltrials.gov/study/NCT01415674>). Plus précisément, nous nous sommes appuyés sur la caractérisation de biomarqueurs pharmacodynamiques d'efficacité pour répondre à cet objectif de thèse.

PREDICTOR est une étude de phase II randomisée menée en ouvert chez des patients atteints de CETC localisés et non prétraités répartis aléatoirement entre un bras afatinib (40mg/jour pour une durée totale de 21 à 28 jours) et un bras contrôle (sans traitement) en situation préopératoire. Les objectifs de recherche translationnelle de PREDICTOR étaient les suivants :

- Identifier des biomarqueurs prédictifs d'efficacité en corrélant des biomarqueurs potentiels avant traitement aux réponses radiologiques et métaboliques (objectif principal) ;
- Identifier des biomarqueurs pharmacodynamiques d'efficacité en corrélant l'activation ou l'inhibition de biomarqueurs potentiels aux réponses radiologiques et métaboliques (objectif secondaire).

J'ai pu collaborer à l'interprétation des variants pathogènes ainsi qu'à l'analyse et à l'interprétation des données de déconvolution du transcriptome. Ma contribution a également consisté (i) à implémenter et à consolider la base de données cliniques destinée aux analyses de corrélation des biomarqueurs, (ii) à réaliser les analyses d'enrichissement des voies de signalisation oncogéniques à partir du séquençage du transcriptome, (iii) à analyser les données d'expression des (phospho)protéines et à interpréter les voies d'activation, (iv) à réaliser la plupart des tests et les statistiques descriptives et (v) à réaliser l'ensemble des figures (à l'exclusion des *oncoprints*) et à rédiger le manuscrit.

Les analyses translationnelles de PREDICTOR sont finalisées et un manuscrit validé par l'ensemble des co-auteurs a été soumis à *Scientific Reports* (actuellement en cours de révision par les *reviewers*). Il est joint au chapitre suivant.

3.3.2 Article #2 *Randomized phase II study of preoperative Afatinib in untreated head and neck cancers: predictive and pharmacodynamic biomarkers of efficacy*

Randomized phase II study of preoperative Afatinib in untreated head and neck cancers: predictive and pharmacodynamic biomarkers of efficacy

Grégoire Marret¹, Stéphane Temam², Maud Kamal¹, Caroline Even³, Jean-Pierre Delord⁴,
Caroline Hoffmann⁵, Gilles Dolivet⁶, Olivier Malard⁷, Jérôme Fayette⁸, Olivier Capitain⁹,
Sébastien Vergez¹⁰, Lionel Geoffrois¹¹, Frédéric Rolland¹², Philippe Zrounba¹³, Laurent
Laccourreye¹⁴, Esma Saada-Bouزيد¹⁵, Nicolas Aide¹⁶, Valérie Bénavent¹⁷, Jerzy
Klijianenko¹⁸, Constance Lamy¹, Elodie Girard¹⁹, Sophie Vacher²⁰, Julien Masliah-
Planchon²⁰, Leanne de Koning²¹, Vincent Puard²¹, Edith Borcoman¹, Marta Jimenez¹⁷, Ivan
Bièche²⁰, Jocelyn Gal²², Christophe Le Tourneau^{1,23}, on behalf of the UNICANCER Head
and Neck Group

1: Department of Drug Development and Innovation (D3i), Institut Curie, Paris, France; 2:
Department of Head and Neck Surgery, Gustave Roussy, Villejuif;
3: Head and Neck Oncology Department, Gustave Roussy, Villejuif; 4: Department of
Medical Oncology, Centre Claudius Régaud, Toulouse; 5: Department of Head and Neck
Surgery, Institut Curie, Paris; 6: Department of Head and Neck Surgery, Institut de
Cancérologie de Lorraine, Nancy; 7: Department of Head and Neck Surgery, Centre
Hospitalier Universitaire, Nantes;
8: Department of Medical Oncology, Centre Léon Bérard, Lyon; 9: Department of Medical
Oncology, Centre Paul Papin, Angers; 10: Department of Head and Neck Surgery, Institut
Claudius Regaud, Toulouse; 11: Department of Medical Oncology, Institut de Cancérologie de
Lorraine, Nancy; 12: Department of Medical Oncology, Centre René Gauducheau, Nantes;
13: Department of Head and Neck Surgery, Centre Léon Bérard, Lyon; 14: Department of

Head and Neck Surgery, Centre Hospitalier Universitaire, Angers; 15: Department of Medical Oncology, Centre Antoine Lacassagne, Nice; 16: Department of Nuclear Medicine, Centre François Baclesse, Caen; 17: UNICANCER, Paris; 18: Department of Pathology, Institut Curie, Paris; 19: Bioinformatics core facility, INSERM U900, Mines Paris Tech, Institut Curie, Paris, France; 20: Pharmacogenomics Unit, Genetics Department, Institut Curie, Paris, France; 21: Department of Translational Research, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France; 22: Department of Biostatistics, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France ; 23: INSERM U900, Institut Curie, Paris-Saclay University, Paris, France

Corresponding author

Prof. Christophe Le Tourneau, MD PhD

Institut Curie

Department of Drug Development and Innovation (D3i)

26 Rue d'Ulm, 75005 Paris, France

Phone/Fax : +33-1-4432-4675/+33-1-5310-4006

E-mail : christophe.letourneau@curie.fr

Word count Abstract = 150 (max 200); Text = 2,679 (max 4,500); Figures = 4; Table = 1 (max 8 tables and/or figures); Supplementary Figures = 9; Supplementary Tables = 10; Supplementary Materials = 3; References = 59 (max 60); Pages = 30

Running title Biomarkers of preoperative afatinib in untreated HNSCC

Abstract

There is no strong and reliable predictive biomarker in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) for EGFR inhibitors. We aimed to identify predictive and pharmacodynamic biomarkers of efficacy of afatinib, a pan-HER tyrosine kinase inhibitor, in a window-of-opportunity trial (NCT01415674). Multi-omics analyses were carried out on pre-treatment biopsy and surgical specimen for biological assessment of afatinib activity. Sixty-one treatment-naïve and operable HNSCC patients were randomised to afatinib 40 mg/day for 21-28 days *versus* no treatment. Afatinib produced a high rate of metabolic response. Responders had a higher expression of pERK1/2 ($P=0.02$) and lower expressions of pHER4 ($P=0.03$) and pRB1 ($P=0.002$) in pre-treatment biopsy compared to non-responders. At the cellular level, responders displayed an enrichment of tumor-infiltrating B cells under afatinib ($P=0.02$). At the molecular level, NF-kappa B signaling was over-represented among upregulated genes in non-responders ($P<0.001$; FDR=0.01). Although exploratory, phosphoproteomics-based biomarkers deserve further investigations as predictors of afatinib efficacy.

Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the seventh most common cancer worldwide¹. Early-stage disease can be successfully treated with a single-modality treatment (surgery or radiotherapy), whereas locally advanced disease usually uses multimodality treatments that involve surgery and (chemo)radiotherapy. Around 50% of locally advanced HNSCC recur after primary treatment, at locoregional and/or distant metastatic levels². Patients who are not amenable to local treatments have a dismal prognosis (i.e., 6 to 9 months in the absence of treatment)³.

Increased or sustained activation of the epidermal growth factor receptor's (EGFR) signaling can promote genesis and progression of tumors by providing sustained signals for cell proliferation, anti-apoptotic signaling, angiogenesis, and metastasis⁴⁻⁶. Overexpression of EGFR is a common characteristic of HNSCC and is associated with poor outcomes^{7,8}.

Cetuximab, a monoclonal antibody (mAb) targeting EGFR, is to date the only targeted therapy that demonstrated an overall survival (OS) benefit in HNSCC patients, both in the recurrent and in the locally advanced settings, yet without molecular selection^{9,10}. Lack of durable efficacy due to drug resistance remains a major challenge¹¹. Unlike lung cancers, in which sensitizing *EGFR* mutations predict sensitivity to tyrosine kinase inhibitors (TKIs)^{12,13}, no robust predictive biomarker for cetuximab efficacy has been identified in HNSCC^{14,15}. Various innate and/or acquired resistance mechanisms have been reported¹⁶⁻¹⁸, including activation of other human epidermal growth factor receptors (HERs).

Pan-HER TKIs target all the dimers formed by HER family¹⁹⁻²² and have the potential to overcome cetuximab resistance caused by cross-talk between the EGFR and other HERs²³. Afatinib, a second-generation pan-HER TKI, is a highly selective, potent, and irreversible inhibitor of EGFR, HER2, and HER4 kinases. It also prevents the trans-phosphorylation of HER3^{20,22}. First-line afatinib demonstrated significant improvements in progression-free

survival (PFS) and OS for patients with *EGFR*-mutated non-small cell lung cancers^{24,25}. In unselected HNSCC patients, afatinib modestly improved PFS as compared to methotrexate in second-line recurrent and/or metastatic setting²⁶. Biomarkers analyses showed that PFS was improved in p16-negative, *EGFR*-amplified, *HER3*-low, and *PTEN*-high in this latter patient population²⁷. In a preoperative trial led by the EORTC, afatinib given for two weeks to treatment-naïve, operable HNSCC patients was safe and produced a 70% rate of metabolic response²⁸. None of the aforementioned biomarkers was predictive of response to treatment in this study.

The GEP11 PREDICTOR randomized trial aimed at identifying predictive and pharmacodynamic biomarkers of efficacy of afatinib. The trial also investigated the efficacy and safety of preoperative afatinib in untreated, non-metastatic HNSCC patients.

Results

Patients and treatment

Sixty-one patients were included between January 2012 and July 2015 at seven French cancer centers or university hospitals and were randomized to either afatinib ($N=41$; Arm A) or no treatment ($N=20$; Arm B; **Figure 1**). All patients in Arm A were included in the intention-to-treat population, whereas in Arm B, two out of 20 patients (10%) were excluded (one consent withdrawal and one early death before the scheduled surgery). In Arm A, one patient deemed inoperable following 14 days of afatinib received chemoradiation instead of surgery. Patient characteristics are described in **Table 1**.

Safety and tolerability

The median duration of afatinib treatment was 16 days (range, 3-30 days). Afatinib-related adverse events (AEs) are summarized in the **Supplementary Table 1**. Five patients

discontinued afatinib within 14 days due to afatinib-related AEs, including one grade 4 diarrhea, one grade 4 folliculitis, one grade 3 oral mucositis, one grade 3 diarrhea, and one grade 2 oral mucositis. Mean time between enrolment and surgery was similar in Arm A and Arm B (23.4 *versus* 20.5 days, $P=0.2$).

Efficacy outcomes

Median follow-up was 82.7 months (interquartile range [IQR], 69.8-90.6 months) in Arm A, and 76.6 months (IQR, 70.8-91.5 months) in Arm B. In Arm A, three out of the 41 patients (7.3%; 95% CI, 1.5-19.9) achieved a partial response according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1 (RECIST1.1) *versus* no patients in Arm B ($P=0.03$; **Supplementary Table 2**). A median reduction of the sum of the target lesions of 4.8 mm was observed between baseline and preoperative imaging in Arm A (95% CI, 2.9-6.8; $P<0.001$), and a median of 1.9 mm increase in Arm B (95% CI, 0-3.8; $P=0.05$). In Arm A, 24 out of the 41 patients (58.5%; 95% CI, 42.1-73.7) achieved a partial metabolic response *versus* no patients in Arm B ($P<0.01$).

Positive lymph nodes were diagnosed on resected tumors in 21 out of 41 patients (51%) in Arm A and in 11 out of 18 patients (61%) in Arm B. Among patients with positive lymph nodes, 12 (29%) displayed an extracapsular spread in Arm A *versus* four (22%) in Arm B. Statistical significance was not reached for a difference in the number of patients with positive lymph nodes or extracapsular spreads between the two arms ($P=0.5$ and $P=0.8$, respectively).

Exploratory DNA sequencing (DNaseq) analyses

DNaseq was performed on baseline tumor biopsies from 56 patients, including 37 patients in Arm A and 19 patients in Arm B. Among the 37 patients in Arm A, 35 were evaluable for FDG-

positron emission tomography (FDG-PET) response (22 responders and 13 non-responders; **Supplementary Figure 1**).

Genomic alterations and signaling pathways

Among the 56 patients with contributive DNaseq, 49 (88%) had at least one molecular alteration. Thirty-five patients (62%) had an alteration in *TP53*, 21 (38%) in *CDKN2A*, 19 (34%) in *CCND1*, eight (14%) in *PIK3CA* and *FAT1*, and three (5%) in *EGFR*. Pathogenic promoter mutations in *TERT* were found in 13 patients (23%). Inactivating mutations in *CDKN2A* were found in 12 patients (22%) while *CDKN2A* and *CDKN2B* were co-deleted in nine patients (16%; **Figure 2A**).

Genomic alterations were observed in the genome integrity signaling pathway in 35 patients (62%). Thirty-three patients (59%) had an alteration in the cell cycle pathway, 15 (27%) in the chromatin organization pathway, 13 (23%) in the senescence pathway, 12 (21%) in the apoptosis and the hippo signaling pathways, nine (16%) in the RTK/RAS and the Wnt signaling pathways, and seven (12%) in the PI3K and transcription factor regulator pathways (**Supplementary Figure 2**). Proportions of genomic alterations and altered molecular pathways were similar in both treatment arms (**Supplementary Figures 3A-B**).

Predictive biomarkers of metabolic response to afatinib

Among the 35 patients evaluable for FDG-PET response in Arm A, none of the genomic alterations nor altered molecular pathways were associated with the metabolic response (**Supplementary Table 3**).

Prognostic biomarkers

In post-hoc analyses, the prognostic value of genomic alterations and altered signaling pathways was assessed among the 56 patients with contributive DNaseq on baseline tumor (**Supplementary Table 4**). In univariate analysis, *CDKN2A/B* codeletion was associated with a shorter OS, with an HR of 3.6 (95% CI, 1.4-9.0; **Figure 2B**). *CDKN2A/B* codeletion and *CCND1* amplification were also associated with a shorter PFS (HR, 2.9; 95% CI, 1.2-7.1; and HR, 2.2; 95% CI, 1.0-5.0, respectively; **Figures 2C-D**). Among signaling pathways, alterations in the encompassing cell cycle pathway were associated with a shorter OS (HR, 3.8; 95% CI, 1.3-11.2) and PFS (HR, 2.7; 95% CI, 1.1-6.8; **Supplementary Figures 4A-B**). In contrast with *CDKN2A/B* codeletion, *CDKN2A* mutation had no prognostic value on OS (HR, 1.4; 95% CI, 0.4-5.0) and PFS (HR, 0.8; 95% CI, 0.3-2.2; **Supplementary Figures 5A-B**). *CCND1* amplification and *CDKN2A/B* codeletion had no prognostic value in multivariate analysis on OS and PFS (**Supplementary Table 5**).

We next focused on the top 10% of patients with the highest tumor mutational burden (TMB) scores corresponding to a TMB >15.5 mut/Mb. There was no difference in OS between patients with high TMB (>15.5 mut/Mb) and low TMB (≤15.5 mut/Mb), with an HR of 0.9 (95% CI, 0.22-4.0; **Supplementary Figure 6**).

Exploratory RNA sequencing (RNAseq) analyses

RNAseq was performed on baseline tumor biopsies from 53 patients, including 35 patients in Arm A and 18 patients in Arm B. Among the 35 patients in Arm A, 34 were evaluable for FDG-PET response (19 responders and 15 non-responders). Among them, 26 patients (15 responders and 11 non-responders) had both pre- and post-afatinib tumor samples with available gene expression data analysis (**Supplementary Figure 1**).

Cellular level characterization of pharmacodynamic biomarkers

We quantified the numbers and the types of tumor microenvironment (TME) cells among the 26 patients evaluable for FDG-PET response in Arm A with contributive paired pre- and post-afatinib RNAseq. We applied a deconvolution method on bulk gene expression data, and reported the TME cell fraction changes between pre- and post-afatinib tumor biopsies according to afatinib metabolic response on FDG-PET scan (**Figure 3**). We further computed ratios of post-afatinib/pre-afatinib fractions (or differences in case of null denominator) for each type of TME cells, in responders ($N=15$) and non-responders ($N=11$; **Supplementary Table 6**). We showed higher ratios for B cells in responder than in non-responder patients (median [range] ratio, 1.8 [0.9-5.9] *versus* 0.8 [0.3-5.3]; $P=0.02$).

Molecular level characterization of pharmacodynamic biomarkers

Among the 26 aforementioned patients in Arm A, 600 genes were differentially expressed (267 and 333 upregulated in non-responders and responders, respectively), including the immune markers *ICAM1*, *MEF2C*, *P2RX5*, *HPGD*, and *ZBTB16* (**Supplementary Table 7**). We identified 16 gene sets (**Supplementary Figure 7**) over-represented among upregulated genes in non-responders, including the NF-kappa B signaling ($P<0.001$; false discovery rate [FDR]=0.01). There was no evidence of enrichment among upregulated genes in responder patients.

Prognostic biomarkers

Among the 53 patients with contributive RNAseq, post-hoc unsupervised analysis on bulk gene expression data (representing 13,232 transcripts) identified two clusters of patients (Cluster 1, $N=27$; Cluster 2, $N=26$). In univariate analysis, there was no difference in OS and PFS between these two clusters, with HRs of 0.5 (95% CI, 0.2-1.3) and 0.5 (95% CI, 0.2-1.2), respectively

(Supplementary Figures 8A-B). Clinical and histological characteristics of each cluster are presented in the **Supplementary Table 8**.

Exploratory Reverse Phase Protein Arrays (RPPA) analyses

Protein extracts from baseline tumor biopsies were retrieved from 42 patients (26 patients in Arm A and 16 patients in Arm B) and were evaluated by RPPA methods by using a panel of 77 antibodies. Among the 26 patients in Arm A, 25 were evaluable for FDG-PET response (14 responders and 11 non-responders; **Supplementary Figure 1**).

Predictive biomarkers of metabolic response to afatinib

In the 25 patients evaluable for FDG-PET response in Arm A, we analyzed the relative expressions of phosphoproteins/proteins in pre-afatinib tumor biopsies according to metabolic response (**Supplementary Figure 9**). We showed higher phosphorylation levels of p44/p42 MAPK (ERK1/2) in responders than in non-responders (median [range] ratio, 1.2 [-40.5-7.3] *versus* -1.4 [-4.0-5.7]; $P=0.02$) and lower phosphorylation levels of HER4 (median [range] ratio, 0.09 [-3.7-4.1] *versus* 1.0 [-0.002-122.0]; $P=0.03$) and RB1 (median [range] ratio, -1.0 [-14.7-0.5] *versus* 0.7 [-3.4-9.8]; $P=0.002$; **Figure 4**).

Prognostic biomarkers

Among the 42 patients with contributive RPPA, post-hoc unsupervised clustering on protein expression data identified two clusters of patients that did not significantly correlate with OS (HR, 1.7; 95% CI 0.6-4.6) or PFS (HR, 1.3; 95% CI, 0.5-3.4) in univariate analysis (data not shown).

Discussion

Short course of afatinib in untreated, operable, non-metastatic HNSCC patients induced a high rate of partial metabolic responses and partial responses according to RECIST1.1 without delaying surgery. Baseline phosphorylation levels of RB1, ERK1/2, and HER4 correlated with metabolic responses to afatinib. At the cellular level, we showed a significant enrichment of tumor-infiltrating B cells under afatinib in responders, while at the molecular level, the NF-kappa B signaling was found to be enriched among upregulated genes in non-responders. In post-hoc analyses, we reported the negative prognostic values of *CCND1* amplification and *CDKN2A/B* codeletion although these results were not confirmed in multivariate analyses.

Seven percent of the patients achieved a partial response according to RECIST1.1, and 59% achieved a partial metabolic response as compared with 22% and 70% in a similar study run by the EORTC²⁸. The lower response rates observed in our trial might be explained 1) by the higher proportion of patients with advanced disease at diagnosis (51% versus 33% of T4 stage tumors) and 2) by a difference in metabolic tumor response assessments, since in the EORTC study the last dose of afatinib was given strictly two hours before the FDG-PET scan before surgery.

Safety and tolerability were as expected regarding the toxicity profile of afatinib. Up to 12% of patients in Arm A stopped afatinib early because of toxicity, which might impact the results of translational analyses because of the lack of sufficient drug exposure. Importantly, all reported AEs were manageable and did not delay the planned definitive surgery, the latter representing a major concern with window-of-opportunity trials²⁹.

In comparison with the TCGA cohort³⁰, cell cycle regulatory genes were less frequently altered in our study, with lower rates of *CDKN2A* alteration (38% versus 50%) and *CDKN2A/B* codeletion (16% versus 27%). This might be explained by the fact that we applied a more stringent variant selection algorithm when taking into account copy number deletions. The negative prognostic impact of *CDKN2A* (that encodes p15) alteration is well established in HNSCC^{31,32}, as opposed to *CDKN2B* (that encodes p16) homozygous deletion. We found that

CDKN2A/B codeletion but not *CDKN2A* mutation alone correlated with poor survival outcomes, suggesting a key role of both p15 and p16 losses in determining the prognosis of *CDKN2A/B* co-deleted HNSCC.

We identified higher metabolic response to afatinib in patients with low pre-treatment HER4 activity. This result is not in line with what has been observed in preclinical model. A xenograft model of HNSCC identified a *HER4*-activating oncogenic mutation leading to increased HER4 phosphorylation, which suggested that it may activate other HERs as a heterodimer and predict sensitivity to afatinib³³. These results highlight the controversial role of HER4 in cancers, which may act as a tumor suppressor protein or as an oncoprotein³⁴. Our findings also support the hypothesis that constitutive activation of ERK1/2 (based on assessments of functional T202 and Y204 phosphosites) may serve as predictive biomarker of activity of afatinib. ERK1/2 induces the transcription and the translation of cyclin D1, thus promoting G1/S progression through cyclin D1-CDK4/6-mediated phosphorylation of RB1³⁵. Unexpectedly, we reported lower relative expressions of phosphoproteins/proteins for RB1 in responder patients than in non-responder patients, suggesting other mechanisms of cell cycle activation besides CDK4/6-mediated phosphorylation of RB1.

At the cellular level, pharmacodynamic analyses on the TME elucidated B cells changes in response to afatinib which may rely on the (re)activation of a tumor-targeting immune response³⁶. At the molecular level, Over Representation Analysis findings suggested mechanisms of resistance to afatinib associated with tumor invasion and metastasis through NF-kappa-B signaling enrichment^{37,38}, a molecular feature of the 42-gene Chung's high-risk signature³⁹.

Our study has several limitations. First, mean tumor reduction was lower than anticipated and correlative biomarkers analyses were based instead on metabolic response, which was not a predefined primary endpoint. In addition, no adjustment for multi-test were carried out, thus

rendering biomarkers analyses mainly exploratory. Second, the specificity of FDG-PET scan to predict afatinib efficacy is unknown. In some pre-clinical and clinical studies, however, metabolic responses to targeted therapies have been shown to correlate with residual tumor cellularity, tumor shrinkage, and improved time to progression⁴⁰⁻⁴². Third, we did not confirm the biomarkers findings from the LUX-Head and Neck 1 trial²⁷, which demonstrated a higher efficacy of afatinib in p16-negative, EGFR-amplified, HER3-low, and PTEN-high HNSCC patients. This can be due to the intrinsic nature of window-of-opportunity trial, in which patients are exposed to drugs during a short period of time, impairing the onset of potential acquired drug resistance. Fourth, recent data underscored the importance of tertiary lymphoid structure in TME and their interplay with B cells in eliciting antitumor responses^{43,44}. We did not implement spatial information and functional orientation of tumor-infiltrating immune cells and related B cell phenotypes and functions. In this regard, our understanding of the immune contexture is limited.

Overall, we found that short course of preoperative afatinib induced a high rate of metabolic response without delaying the planned definitive surgery in treatment-naïve HNSCC patients selected for primary curative surgery. Baseline expression of pHER4, pERK1/2 and pRB1 together with B cells enrichment and NF-kappa B signaling activation correlated with metabolic response to afatinib. Although exploratory, these phosphoproteomics-based biomarkers deserve further investigations as predictors of afatinib efficacy. More mechanistic studies are needed to reliably establish the link between B cells enrichment, NF-kappa B signaling activation and sensitivity to HER family blockers in HNSCC.

Methods

Study objectives and endpoints

The main objective consisted in identifying predictive biomarkers of efficacy by exploring correlation between baseline potential biomarkers and radiological and metabolic responses to afatinib. Secondary objectives were to identify potential pharmacodynamic biomarkers, to evaluate the efficacy and safety of afatinib and to assess the metabolic and pathologic responses. We also did post-hoc analyses to evaluate the prognostic significance of recurrent genomic alterations and TMB in HNSCC.

The primary endpoint was the biological assessment of afatinib activity by performing translational researches in pre-treatment biopsy and surgical specimen. Translational researches included DNaseq, RNAseq and high throughput protein analysis using RPPA methods.

For secondary endpoints, efficacy was defined as the tumor size reduction between baseline and before surgery. The tumor size was the sum of two target lesions following measurement rules on CT scan/MRI of the head and neck according to RECIST1.1⁴⁵. Metabolic response was measured on FDG-PET scan according to Positron Emission Tomography Response Criteria in Solid Tumours (PERCIST)⁴⁶. Patients with a partial metabolic response were considered as responders, whereas patients with a stable or a progressive metabolic disease were considered as non-responders. The toxicity was assessed according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0. Pathologic response was assessed on resected lymph nodes by the presence or not of invasive tumor.

For post-hoc analyses, OS was defined as the time from randomization until death from any cause or last follow-up. PFS was defined as the time from randomization to disease progression or death from any cause or last follow-up.

Study design and participants

The GEP11 PREDICTOR trial was an open-label, randomized, multicentric, controlled, phase II trial evaluating preoperative afatinib *versus* no treatment in patients with untreated, operable,

non-metastatic T2-4 N0-2 (American Joint Committee on Cancer, 7th edition) HNSCC of the oral cavity, pharynx, and larynx. Randomization was stratified by primary tumor site (oropharynx *versus* non-oropharynx). All patients provided written informed consent before enrollment. The trial was approved by a national ethics committee. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. All experimental protocols were approved by UNICANCER.

Treatment and procedures

Patients were randomized (2:1) to receive oral afatinib 40 mg/day for 21 to 28 days (Arm A) or no treatment (Arm B) before surgery. Surgery was not delayed as compared to standard of care. Tumor biopsies were collected during baseline endoscopy and surgery. FDG-PET scans were performed before the endoscopy, and at day 15 after treatment initiation. FDG-PET scans examinations were performed on the same system at baseline and before surgery, and assessed by central imaging review (FDG-PET unit of the François Baclesse Cancer Center) as per the EANM guidelines⁴⁷. CT scan/MRI were performed before the endoscopy and after the end of treatment within one week prior to surgery.

DNA sequencing

Samples were sequenced using a dedicated next-generation sequencing (NGS) panel targeting 571 genes (named “DRAGON”). Genes were classified regarding the literature and databases (cBioPortal and OncoKB^{48,49}) in tumor suppressor genes (TSG), oncogenes, and genes considered as both an oncogene and a TSG. Genes were categorized according to the cellular pathway in which they were involved (**Supplementary Table 9**).

DNAseq protocol

Indexed paired-end libraries of tumor DNA were performed using the Agilent Sureselect XT2 library prep kit. The kit supports sequencing targeted regions of the genome spanning 2.7 Mb. About 50 ng of input DNA were used to build the libraries according to manufacturer's protocol. The pool was finally sequenced on a NovaSeq 6000 (Illumina) S2x150 bp flow cell.

Data processing

Reads mapping: In the first analysis part, reads were mapped using BWA mem software (v0.7.15, Li, 2013) on the Human reference genome (hg19 assembly) using default parameters. As a second quality control, statistics regarding the mapping (percentage of aligned reads total and falling into the capture, percentage of PCR duplicates) and the capture coverage were produced using a combination of SAMtools, flagstat, BEDtools coverage and PicardTools MarkDuplicates.

Variant calling: Variant calling of both single nucleotide variations (SNVs) and small insertion/deletions (indels) was then performed on the processed alignment files using a combination of the SAMtools mpileup⁴⁹ and *VarScan2* *mpileup2cns* (v2.4.3)⁵⁰.

Annotations: Annotations from several databases (RefSeq, dbsnp v150, COSMIC v86, 1000g project 08/2015 version, ESP6500, gnomAD [all and ethnies], ICGC v21, and dbnsfp v35 predictions) were provided by ANNOVAR to annotate small variants⁵¹. Only the RefSeq database was used for intermediate-indel. During this step, all variants present in -10/+10 bp of each exon junction were defined as splicing.

Coverage quality control: A more detailed notion of each gene percentage, per barcode, covered by at least 100X, in the processed alignments, was also provided using a combination of awk, SAMtools mpileup, BEDtools intersect, multiinter and merge. Bases covered by less than 100X were reported per barcode using the same strategy. Genes belonging to patient

pathology were tagged in these two files to facilitate the search for genes of interest that might be badly covered.

Bioinformatics analyses

Variant selection algorithm: Stringent selection algorithm was applied to remove a maximum of irrelevant variants. We considered a minimal allelic ratio of 5% and a maximal frequency in the population of 0.1%. Only truncating mutations (frameshift deletion and insertion, stopgain, splicing alteration and hotspot mutations from Cancer Hotspot database) with a minimal coverage of 200 reads were retained for tumor suppressor gene variants. All missense variants known to be hotspot mutations from Cancer Hotspot database and no minimal coverage were retained for oncogenes variants⁵². For genes classified as both oncogenes and TSG (such as *NOTCH1*) or with known missense hotspots (like *TP53*), truncating mutations with a minimal coverage of 200, and known hotspots mutations with no minimal coverage were selected.

Oncoprints: Oncoprints were drawn using the ComplexHeatmap package and were performed with the Maftools package for 4.00 version of R.

Tumor Mutational Burden: TMB was defined as the number of non-synonymous somatic mutations (SNVs and small indels) per mega-base in coding regions (mut/Mb). Coding variants (except for intronic splicing ones, therefore exons-only which represent 1.59 Mb), without synonymous nor polymorphisms (>0.1% minor allele frequency [MAF]) and recurrent variants covered enough (not tagged as Low_Depth) were considered in all those calculations. Because the median and range of mutational load have been shown to vary across tumor types, we focused on the top 10% patients with the highest TMB scores and determined the log-rank p value for difference in survival among the 10% top TMB and 90% bottom TMB subgroups of patients.

RNA sequencing

3' Tag-Seq protocol

High-throughput 3' Tag RNAseq was performed on frozen and formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) tumor RNA (100 ng). We used the QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit (for Illumina) from Lexogen company. In contrast to traditional RNA-seq, which generates sequencing libraries for the whole transcript, 3' Tag-Seq only generates a single initial library molecule per transcript, complementary to 3' end sequences.

Data processing

RNAseq data was analyzed using the bioinformatics pipeline developed in Institut Curie and available at <https://github.com/bioinfo-pf-curie/RNAseq>. Briefly, raw sequencing reads were checked for quality, trimmed for potential adapter sequences and aligned on the Human reference genome with the STAR software. State-of-the-art quality controls such as library complexity, alignment statistics, duplication level, reads annotation were performed in order to ensure a high-quality of RNAseq samples. Gene expression quantification was performed with the featureCounts tool on the coding genes annotation extracted from the Gencode project.

Bioinformatics analyses

Unsupervised clustering k-sparse methods⁵³ with number of cluster (k) equal to two of bulk-tissue RNAseq data was used. A batch effect-correction algorithm (<https://github.com/Jfortin1/ComBatHarmonization>) was then applied in an attempt to mitigate the dataset technical heterogeneity. The ComBat method, initially described in genomics, is a realignment method used to deal with the batch effect. In genomics, the batch effect represents individual variations due only to variations between technicians, laboratories, or the days of manipulations.

Identification of differentially expressed genes: We computed ratios of surgery/biopsy normalized gene expression levels as measured by RNAseq, with “biopsy” referring to treatment-naïve tumor samples, and “surgery” the paired post-afatinib ones. The Mann-Whitney U test was performed to identify variability of expression ratios between two response (responders *versus* non-responders) groups. A cut-off of p-value <0.05 was applied to select the most differentially expressed genes in the context of therapy.

Pathway enrichment analyses: Over Representation Analysis (ORA) was used for enrichment analysis⁵⁴. Pathway enrichment was computed using the Kyoto Encyclopedia of Genes datasets (KEGG) dataset with hypergeometric test false discovery rate ≤ 0.1 . Network-based pathway enrichment analyses were performed using ratios of surgery/biopsy gene expression levels across responders and non-responders in the bulk-tissue RNAseq data. In the bulk-tissue, the differentially expressed genes in the context of therapy that had a p-value <0.05 were selected as input for pathway analyses. ORA was performed separately by the direction of change in gene expression in order to identify gene sets that are over-represented when we only consider genes that are up- or down-regulated in one condition relative to another. KEGG datasets were retrieved from the R package software clusterProfiler v4.5.0⁵⁵.

Deconvolution of tumor microenvironment immune cells: The R package software quanTIseq⁵⁶ was applied to bulk RNAseq data from paired pre- and post-tumor samples to quantify the fractions of ten immune cell types, including B cells, M1 and M2 macrophages, monocytes, neutrophils, natural killer cells, non-regulatory CD4+ T cells, CD8+ T cells, T_{reg} cells and myeloid dendritic cells. quanTIseq also estimated the proportion of uncharacterized cells, namely cells that were present in the cell mixture of interest but were not represented in the signature matrix (e.g., cancer cells). Importantly, quanTIseq scores are proportional to the amount of each cell population in the total sample, thus allowing intra- and inter-sample comparison for each population.

High throughput protein analysis

High throughput protein analysis used RPPA methods. The samples were processed as previously described⁵⁷ and printed onto nitrocellulose covered slides (Supernova, Grace Biolabs) using a dedicated arrayer (2,470 arrayer, Aushon Biosystems). Five serial dilutions, starting at 2000 mg/ml and two technical replicates per dilution were printed for each sample. Arrays were labelled with 77 specific, or without primary antibody (as negative control), as previously described⁵⁷. All primary antibodies used in RPPA have been previously tested by Western Blotting to assess their specificity for the protein of interest. Raw data were normalized using Normacurve⁵⁸, which normalizes for fluorescent background per spot, a total protein stain and potential spatial bias on the slide. Next, each RPPA slide was median centered and scaled (divided by median absolute deviation). We then corrected for remaining sample loading effects individually for each array by correcting the dependency of the data for individual arrays on the median value of each sample, over all 77 arrays, using a linear regression.

The panel covered post translationally modified cancer pathway proteins, including phosphorylated and non-phosphorylated proteins derived from cell cycle, cell migration, genome integrity, immunity, metabolism, JAK/STAT signaling, MAPK signaling, NF-kappa B signaling, PI3K/AKT/mTOR signaling, receptor tyrosine kinase signaling, and Wnt/ β -catenin signaling pathways (**Supplementary Table 10**).

Statistical analyses

The sample size was calculated to have a 90% power to detect a difference in treatment effect between biomarker positive *versus* biomarker negative patients. The treatment effect was defined as the difference in the tumor size evolution between the two arms. Since the observed mean tumor reduction under afatinib was less than the anticipated threshold of 20%⁵⁹,

correlative biomarkers analyses were done on the basis of the metabolic response and thus remained mainly exploratory.

All statistical analyses were performed using R software. Comparisons between groups were assessed using the Wilcoxon rank-sum test for quantitative variables, and the Fisher test for qualitative variables. For post-hoc analyses, univariate and multivariate Cox proportional hazard models were performed to identify prognostic biomarkers. The results are presented as hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CIs). Survival curves were obtained with Kaplan-Meier estimates and compared using the log-rank test. The level of significance was set at $P < 0.05$. Correction for multiple testing was not applied.

Data availability

Original files and raw data files from the GEP11 PREDICTOR clinical trial will be made available from the corresponding authors upon reasonable request. The data are not publicly available due to information that could compromise the privacy of the research participants. All processed data used for the analyses are available in the **Supplementary Materials**.

Figure legends

Figure 1 Consort diagram

Figure 2 Overview of gene alterations in untreated, operable, non-metastatic HNSCC patients ($N=56$) (A). Prognostic value of *CDKN2A/B* co-deletion on overall survival (B), and progression-free survival (C). Prognostic value of *CCND1* amplification on progression-free survival (D).

Figure 3 Tumor microenvironment cell fraction changes between pre- and post-afatinib tumor biopsies in responder ($N=14$) and non-responder patients ($N=11$) according to the metabolic response on FDG-PET scan by PERCIST. Tumor microenvironment cells included B cells (A), macrophages (B), monocytes (C), neutrophils (D), NK cells (E), T cells CD4+ (F) and T cells CD8+ (G). Uncharacterized cells, which were representative of cells outside immune subtypes (including tumor cells), were also reported (H).

Figure 4 Correlation between phosphorylation levels of p44/p42 MAPK (ERK1/2), HER4, and RB1 and metabolic response on FDG-PET scan according to PERCIST (responders, $N=14$; non-responders, $N=11$)

p/np, phosphoproteins/proteins

Abbreviations

AE Adverse Event; CI Confidence Interval; CTCAE National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events; DNaseq, DNA Sequencing; DRAGON Detection of Relevant Alterations in Genes involved in Oncogenetics; FFPE Frozen and Formalin Fixed and Paraffin Embedded; HER Human Epidermal Growth Factor Receptor; HR Hazard Ratio; HNSCC Head and neck squamous cell carcinoma; EGFR Epidermal Growth Factor Receptor; FDG-PET FDG-Positron Emission Tomography; FDR False Discovery Rate; GSEA Gene Set Enrichment Analysis; IQR Interquartile Range; mAb Monoclonal Antibody; NGS Next Generation Sequencing; ORA Over Representation Analysis; OS Overall Survival; PERCIST Positron Emission Tomography Response Criteria in Solid Tumours; PFS Progression-Free Survival; RECIST1.1 Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1; RNAseq, RNA Sequencing; RPPA Reverse Phase Protein Arrays; TKI Tyrosine Kinase Inhibitor; TME Tumor Micro Environment; TSG Tumor Suppressor Gene; TMB Tumor Mutational Burden

Acknowledgments and funding

We thank the patients, their families, and all of the investigators who participated in the study.

We acknowledge afatinib supply and financial support from Boehringer Ingelheim France. We thank Bérengère Ouine and Sabine Rajkumar for performing the RPPA experiments.

Conflicts of interest

C. Le Tourneau: Roche, Seattle Genetics, Rakuten, Nanobiotix, MSD, BMS, Merck Serono, AstraZeneca, GlaxoSmithKline, Novartis, Celgene, Exscientia, ALX Oncology, Seattle Genetics.

M. Kamal: Roche.

E. Borcoman: Eisai, Merck Serono, Sandoz, Daiichi Sankyo, Egle Tx.

References

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394–424 (2018).
2. Leeman, J. E. *et al.* Patterns of Treatment Failure and Postrecurrence Outcomes Among Patients With Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma After Chemoradiotherapy Using Modern Radiation Techniques. *JAMA Oncol* **3**, 1487–1494 (2017).
3. Chow, L. Q. M. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* **382**, 60–72 (2020).
4. Herbst, R. S. & Shin, D. M. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* **94**, 1593–1611 (2002).
5. Gibson, E. M., Henson, E. S., Haney, N., Villanueva, J. & Gibson, S. B. Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release. *Cancer Res* **62**, 488–496 (2002).
6. Perrotte, P. *et al.* Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* **5**, 257–265 (1999).
7. Ang, K. K. *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* **62**, 7350–7356 (2002).
8. Cohen, E. E. W. Role of epidermal growth factor receptor pathway-targeted therapy in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* **24**, 2659–2665 (2006).
9. Vermorken, J. B. *et al.* Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1116–1127 (2008).
10. Bonner, J. A. *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the

head and neck. *N. Engl. J. Med.* **354**, 567–578 (2006).

11. Cohen, R. B. Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Cancer Treat Rev* **40**, 567–577 (2014).
12. Yang, Z. *et al.* Comparison of gefitinib, erlotinib and afatinib in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Int J Cancer* **140**, 2805–2819 (2017).
13. Paz-Ares, L. *et al.* Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol* **28**, 270–277 (2017).
14. Licitra, L. *et al.* Evaluation of EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy in the first-line treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: EXTREME study. *Ann. Oncol.* **22**, 1078–1087 (2011).
15. Licitra, L. *et al.* Predictive value of epidermal growth factor receptor expression for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with head and neck and colorectal cancer: analysis of data from the EXTREME and CRYSTAL studies. *Eur. J. Cancer* **49**, 1161–1168 (2013).
16. Brand, T. M., Iida, M. & Wheeler, D. L. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* **11**, 777–792 (2011).
17. Wheeler, D. L. *et al.* Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* **27**, 3944–3956 (2008).
18. Rabinowits, G. & Haddad, R. I. Overcoming resistance to EGFR inhibitor in head and neck cancer: a review of the literature. *Oral Oncol* **48**, 1085–1089 (2012).
19. De Pauw, I. *et al.* Preclinical and clinical studies on afatinib in monotherapy and in combination regimens: Potential impact in colorectal cancer. *Pharmacol Ther* **166**, 71–83

(2016).

20. Li, D. *et al.* BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* **27**, 4702–4711 (2008).
21. Minkovsky, N. & Berezov, A. BIBW-2992, a dual receptor tyrosine kinase inhibitor for the treatment of solid tumors. *Curr Opin Investig Drugs* **9**, 1336–1346 (2008).
22. Solca, F. *et al.* Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J Pharmacol Exp Ther* **343**, 342–350 (2012).
23. Iida, M. *et al.* Targeting the HER Family with Pan-HER Effectively Overcomes Resistance to Cetuximab. *Mol Cancer Ther* **15**, 2175–2186 (2016).
24. Sequist, L. V. *et al.* Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* **31**, 3327–3334 (2013).
25. Wu, Y.-L. *et al.* Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **15**, 213–222 (2014).
26. Machiels, J.-P. H. *et al.* Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. **16**, 583–594 (2015).
27. Cohen, E. E. W. *et al.* Biomarkers predict enhanced clinical outcomes with afatinib versus methotrexate in patients with second-line recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Ann. Oncol.* **28**, 2526–2532 (2017).
28. Machiels, J.-P. *et al.* Activity and safety of afatinib in a window preoperative EORTC study in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Ann Oncol* **29**, 985–991 (2018).

29. Marret, G., Borcoman, E. & Le Tourneau, C. Window-of-opportunity clinical trials for biomarker discovery in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* **35**, 158–165 (2023).
30. cBioPortal for Cancer Genomics. <https://www.cbioportal.org/>.
31. Dubot, C. *et al.* Comprehensive genomic profiling of head and neck squamous cell carcinoma reveals FGFR1 amplifications and tumour genomic alterations burden as prognostic biomarkers of survival. *Eur J Cancer* **91**, 47–55 (2018).
32. Chen, W. S. *et al.* CDKN2A Copy Number Loss Is an Independent Prognostic Factor in HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol* **8**, 95 (2018).
33. Nakamura, Y. *et al.* Afatinib against Esophageal or Head-and-Neck Squamous Cell Carcinoma: Significance of Activating Oncogenic HER4 Mutations in HNSCC. *Mol Cancer Ther* **15**, 1988–1997 (2016).
34. Segers, V. F. M., Dugaucquier, L., Feyen, E., Shakeri, H. & De Keulenaer, G. W. The role of ErbB4 in cancer. *Cell Oncol (Dordr)* **43**, 335–352 (2020).
35. Wee, P. & Wang, Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)* **9**, 52 (2017).
36. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* **28**, 690–714 (2015).
37. Pikarsky, E. *et al.* NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* **431**, 461–466 (2004).
38. Yan, M. *et al.* Correlation of NF-kappaB signal pathway with tumor metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **10**, 437 (2010).
39. Chung, C. H. *et al.* Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk

head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **66**, 8210–8218 (2006).

40. Zander, T. *et al.* Early prediction of nonprogression in advanced non-small-cell lung cancer treated with erlotinib by using [(18)F]fluorodeoxyglucose and [(18)F]fluorothymidine positron emission tomography. *J Clin Oncol* **29**, 1701–1708 (2011).
41. Schmitz, S. *et al.* Tumour response and safety of cetuximab in a window pre-operative study in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* **24**, 2261–2266 (2013).
42. Vergez, S. *et al.* Preclinical and clinical evidence that Deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose positron emission tomography with computed tomography is a reliable tool for the detection of early molecular responses to erlotinib in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 4434–4445 (2010).
43. Li, K. *et al.* Oral cancer-associated tertiary lymphoid structures: gene expression profile and prognostic value. *Clin Exp Immunol* **199**, 172–181 (2020).
44. Ruffin, A. T. *et al.* B cell signatures and tertiary lymphoid structures contribute to outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Commun* **12**, 3349 (2021).
45. Eisenhauer, E. A. *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* **45**, 228–247 (2009).
46. Wahl, R. L., Jacene, H., Kasamon, Y. & Lodge, M. A. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med* **50 Suppl 1**, 122S–50S (2009).
47. Boellaard, R. *et al.* FDG PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour imaging: version 2.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **42**, 328–354 (2015).
48. Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* **6**, p11 (2013).
49. Chakravarty, D. *et al.* OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis*

Oncol **2017**, (2017).

50. Koboldt, D. C. *et al.* VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics* **25**, 2283–2285 (2009).
51. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* **38**, e164 (2010).
52. Chang, M. T. *et al.* Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat Biotechnol* **34**, 155–163 (2016).
53. Gilet, C., Deprez, M., Caillau, J.-B. & Barlaud, M. Clustering with feature selection using alternating minimization, Application to computational biology. Preprint at <https://doi.org/10.48550/arXiv.1711.02974> (2019).
54. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545–15550 (2005).
55. Wu, T. *et al.* clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (Camb)* **2**, 100141 (2021).
56. Finotello, F. *et al.* Molecular and pharmacological modulators of the tumor immune contexture revealed by deconvolution of RNA-seq data. *Genome Med* **11**, 34 (2019).
57. Meseure, D. *et al.* Prognostic value of a newly identified MALAT1 alternatively spliced transcript in breast cancer. *Br J Cancer* **114**, 1395–1404 (2016).
58. Troncale, S. *et al.* NormaCurve: a SuperCurve-based method that simultaneously quantifies and normalizes reverse phase protein array data. *PLoS One* **7**, e38686 (2012).
59. Thomas, F. *et al.* Pilot study of neoadjuvant treatment with erlotinib in nonmetastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**, 7086–7092 (2007).

Table 1. Patient characteristics

	Arm A	Arm B	Total
	(N=41)	(N=18)	(N=59)
Age, years			
Median	58.5	60.2	59.5
Range	44-74	46-76	44-76
Sex, n (%)			
Male	32 (78%)	15 (83%)	47 (80%)
Female	9 (22%)	3 (17%)	12 (20%)
ECOG status, n (%)			
Unknown	1 (2%)	0	1 (2%)
0	27 (66%)	13 (75%)	40 (68%)
1	13 (32%)	5 (25%)	18 (31%)
Smoker, n (%)			
Current	24 (59%)	7 (39%)	31 (53%)
Former	12 (29%)	8 (44%)	20 (34%)
Never	5 (12%)	3 (17%)	8 (14%)
Alcohol consumption, n (%)			
Current	22 (54%)	10 (56%)	32 (54%)
Former	13 (32%)	4 (22%)	17 (29%)
Never	6 (15%)	4 (22%)	10 (17%)
Primary tumor site, n (%)			
Oral cavity	26 (63%)	12 (67%)	38 (64%)
Larynx	0	1 (6%)	1 (2%)
Oropharynx	11 (27%)	3 (17%)	14 (24%)
Hypopharynx	4 (10%)	2 (11%)	6 (10%)
Histologic grade, n (%)			
Unknown	1 (2%)	0	1 (2%)
Well differentiated	21 (51%)	11 (61%)	32 (54%)
Moderately differentiated	12 (29%)	5 (28%)	17 (29%)
Poorly differentiated	7 (17%)	2 (11%)	9 (15%)
HPV status, n (%)			
Unknown	6 (15%)	0	6 (10%)
HPV negative	30 (73%)	16 (89%)	46 (78%)
HPV positive	5 (12%)	2 (11%)	7 (12%)
Pretreatment T-stage^a, n (%)			
T1	1 (2%)	0	1 (2%)
T2	15 (37%)	4 (22%)	19 (32%)
T3	5 (12%)	4 (22%)	9 (15%)
T4	20 (49%)	10 (56%)	30 (51%)
Pretreatment N-stage^a, n (%)			
N0	17 (41%)	12 (67%)	29 (49%)
N1	5 (12%)	2 (11%)	7 (12%)
N2	19 (46%)	4 (22%)	23 (39%)

^aAmerican Joint Committee on Cancer, 7th Edition staging

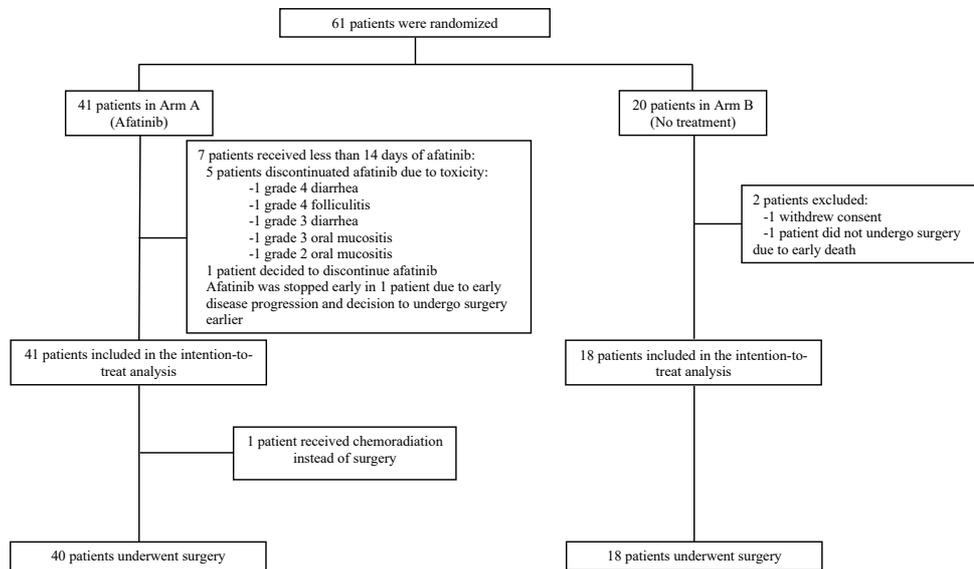


Figure 1

Biomarkers of preoperative afatinib in untreated HNSCC

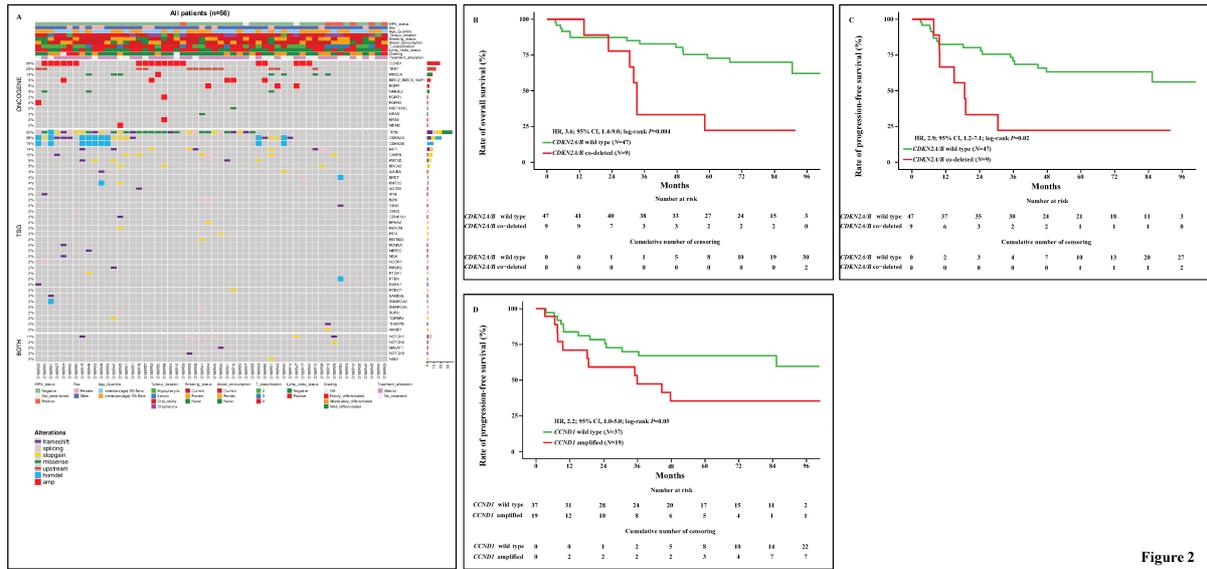


Figure 2

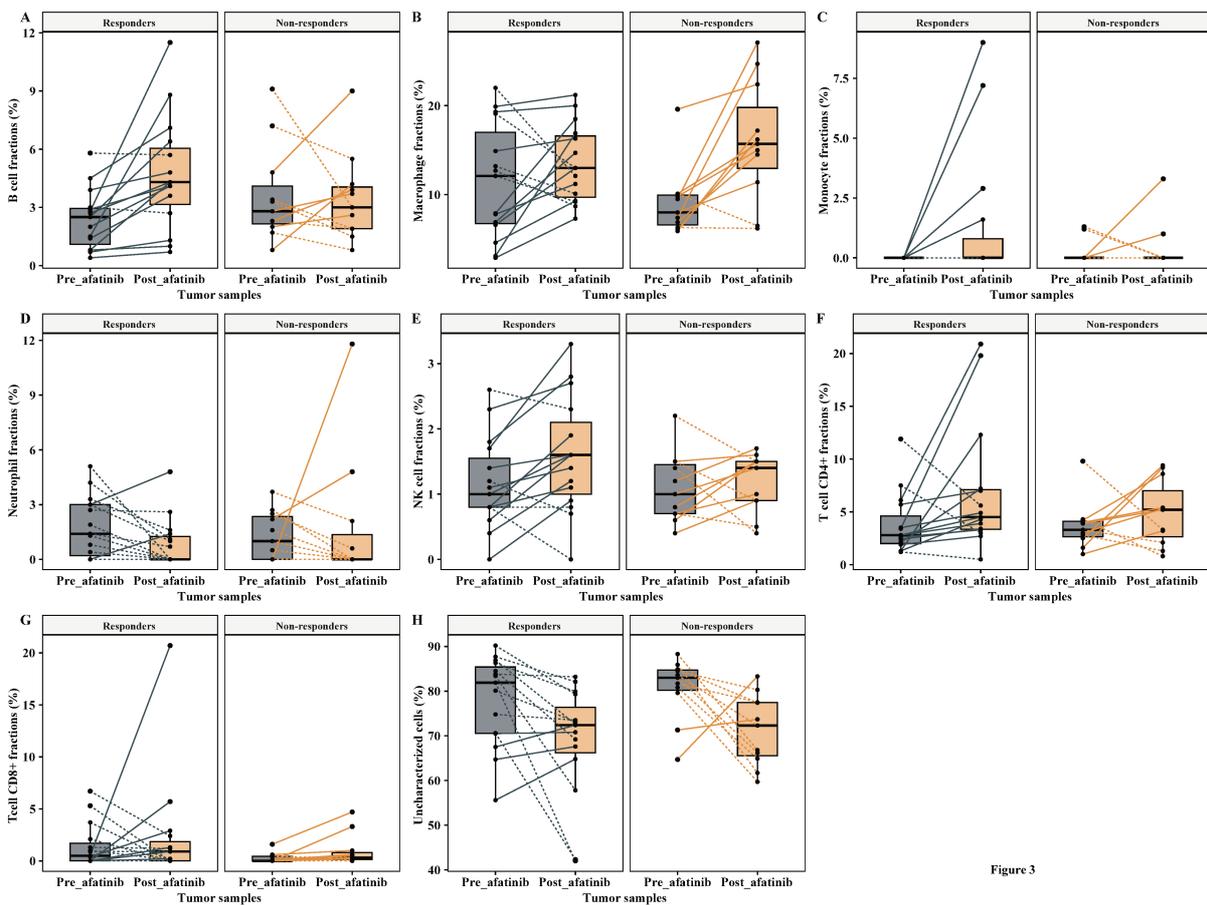


Figure 3

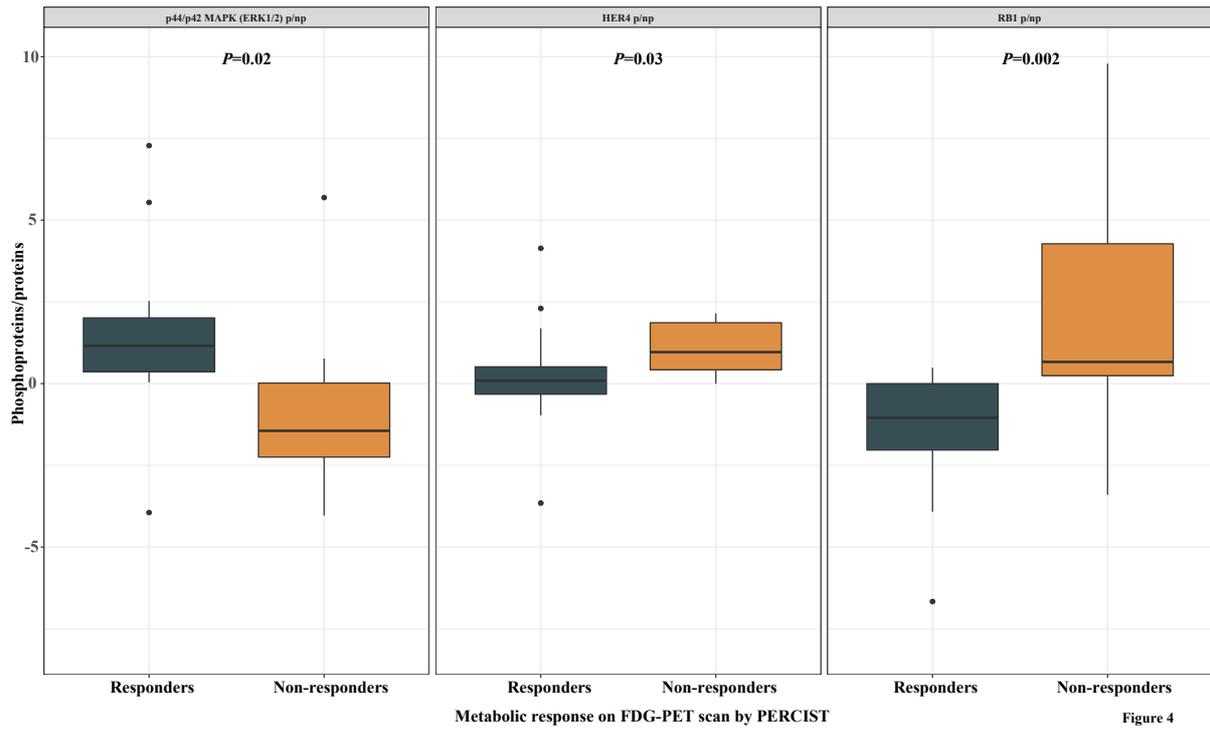


Figure 4

3.3.3 Discussion

Nous rapportons les résultats des analyses translationnelles de l'essai de fenêtre d'opportunité PREDICTOR mené sur 41 patients suivis pour un CETC localisé et non prétraité affectés de manière aléatoire pour recevoir de l'afatinib ($n = 41$) ou aucun traitement ($n = 20$) en situation préopératoire. Après un traitement médian de 16 jours, 3/41 patients (7%) ont présenté une réponse partielle radiologique et 24/41 patients (59%) ont présenté une réponse partielle métabolique. L'efficacité radiologique qui était le critère de jugement principal était inférieure à l'efficacité anticipée par le plan d'analyse statistique. Les biomarqueurs potentiels finalement corrélés à la réponse métabolique étaient exploratoires.

La caractérisation de biomarqueurs pharmacodynamiques a permis de préciser les déterminants cellulaires et moléculaires de l'hétérogénéité temporelle sous thérapie ciblée. Ces biomarqueurs ont pu être identifiés au niveau transcriptomique par le séquençage en masse de 26 prélèvements tissulaires appariés en utilisant la méthode 3'TAG-RNA-Seq.

A l'échelle cellulaire, nous avons précisé la composition du micro-environnement tumoral et son évolution sous afatinib en appliquant l'algorithme bioinformatique *quanTIseq*²⁹⁷. Des signatures d'expression de dix lignées immunitaires ont été utilisées pour l'inférence des fractions cellulaires. Nous avons mis en évidence une augmentation des fractions de lymphocytes B chez des patients avec une réponse métabolique sous afatinib. Ce résultat suggérait un mécanisme d'action médié par la (ré)activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

A l'échelle moléculaire, nous avons identifié 600 gènes dont l'expression différentielle sous traitement corrélait significativement à la réponse métabolique. Les analyses d'enrichissement établies sur la base de données KEGG²⁷¹ ont révélé que les gènes surexprimés chez les patients non répondeurs étaient impliqués dans la voie de signalisation NF-kappa B associée au phénotype invasif et métastatique^{245,298}.

Au-delà des résultats d'analyses translationnelles concourants à caractériser une hétérogénéité temporelle sous thérapie ciblée, d'autres biomarqueurs ont pu être identifiés dans PREDICTOR. Les analyses de lysats protéiques par une méthode RPPA (puces protéiques en phase reverse) ont montré que l'activation constitutive d'ERK1/2 (un facteur de transcription de la cycline D1) était un biomarqueur prédictif de réponse à l'afatinib. Ce résultat suggérait une sensibilité des cellules malignes engagées dans la voie du cycle cellulaire (G1/S) à travers la phosphorylation de RB1 médiée par le complexe cycline D1-CDK4/6. Les répondeurs présentaient également des niveaux d'activation sensiblement inférieurs d'HER4 et de RB1 suggérant un rôle

suppresseur de tumeur d'HER4 et une activité antitumorale de l'afatinib non médiée par l'inhibition de l'axe CDK4/6-RB1.

Sur le plan génomique, des analyses *post hoc* ont montré que l'amplification de *CCND1* et la codélétion de *CDKN2A/B* étaient associées à une augmentation significative du risque de récurrence et de décès. Nous avons enfin précisé l'impact pronostique d'une délétion homozygote 9p21.3 emportant simultanément *CDKN2A* et *CDKN2B* et l'absence de conséquences fonctionnelles d'une mutation inactivatrice de *CDKN2A*.

3.3.4 Perspectives et publications

Dans la continuité de ce travail de thèse, j'ai publié un article sous la supervision du Professeur Christophe Le Tourneau disponible en Annexe 4.1.2 intitulé *Window-of-opportunity clinical trials for biomarker discovery in head and neck squamous cell carcinoma*. Cet article récapitule les essais de fenêtre d'opportunité disponibles dans les CETC tout en discutant leurs rationnels, leurs challenges et leurs limites²⁹⁹.

3.4 Conclusion générale

Les études disponibles dans les CETC s'accordent sur l'omniprésence d'une hétérogénéité génétique intra-tumorale dont l'importance semble corrélée à une diminution de la survie globale et à une augmentation du risque de progression métastatique. Toutefois, ces études établies majoritairement sur l'analyse d'une seule biopsie sous-estiment la part d'hétérogénéité spatiale et temporelle d'une tumeur. Les objectifs de cette thèse de sciences consistaient donc à caractériser de façon plus précise l'hétérogénéité génétique spatiale et temporelle des CETC et à en préciser la valeur pronostique.

Pour y répondre, d'importants moyens humains, matériels, logistiques, techniques et analytiques ont été mis en œuvre. Nous avons pu accéder à de nombreux prélèvements tissulaires et sanguins collectés dans l'étude prospective de *biobanking* SCANDARE (NCT03017573). Cette initiative institutionnelle offre un cadre d'étude idéal pour appréhender l'hétérogénéité et l'évolution du cancer sous une perspective moléculaire en particulier et pour tout projet de recherche translationnelle en général. A notre connaissance, peu d'études longitudinales de *biobanking* sont rapportées à ce jour dans la littérature³⁰⁰⁻³⁰².

Nous avons eu accès également à des biopsies appariées avant et après traitement par thérapie ciblée réalisées dans l'essai de fenêtre d'opportunité PREDICTOR (NCT01415674). Les

biopsies de tumeurs primitives localisés et opérables étaient dédiées à la recherche de biomarqueurs d'efficacité incluant des biomarqueurs pharmacodynamiques.

En tirant parti de la délimitation dense régionale des tissus, nous avons pu caractériser de façon exhaustive l'hétérogénéité génétique intra-tumorale qui existe dans les CETC mais également qui émerge durant la progression tumorale et sous thérapie ciblée. Nous en mesurons pour la première fois l'impact sur la médecine de précision. Nous montrons que le ctDNA est un biomarqueur de maladie résiduelle minimale dont la détection postopératoire corrèle à une augmentation du risque de récurrence. Nos travaux ont permis d'ajouter des connaissances dans la compréhension des processus cellulaires impliqués dans l'hétérogénéité spatiale de ces tumeurs et ont montré qu'une évolution sous thérapie ciblée du micro-environnement tumoral et de l'activité NF- κ B permettait de prédire une réponse thérapeutique.

Deux manuscrits ont été entièrement rédigés dont un soumis à *Scientific Reports* en cours de révision. Dans la continuité de ces travaux, les données de séquençage multirégional du génome et du transcriptome serviront de base pour préciser l'hétérogénéité du micro-environnement tumoral et caractériser des trajectoires évolutives redondantes et pronostiques des CETC.

Les travaux dédiés à l'hétérogénéité génétique temporelle appréhendée par le ctDNA ont été récompensés à l'occasion du congrès annuel de l'AACR 2023 par un prix *Scholar-in-Training Award* décerné par la Fondation Margaret Foti.

4 Annexes

4.1 Articles connexes et abstracts

4.1.1 Article #3 *Genomic Alterations in head and neck squamous cell carcinoma: level of evidence according to ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT)*



Genomic Alterations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Level of Evidence According to ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT)

Grégoire Marret, MD¹; Ivan Bièche, PharmD^{2,3}; Célia Dupain, PhD⁴; Edith Borcoman, MD⁴; Pauline du Rusquec, MD⁴; Francesco Ricci, MD⁴; Ségoène Hescot, MD⁴; Marie-Paule Sablin, MD⁴; Patricia Tresca, MD⁴; Diana Bello, MD⁴; Coraline Dubot, MD⁴; Delphine Loirat, MD⁴; Maxime Frelaut, MD⁴; Charlotte Lecerf, PhD⁴; Christophe Le Tourneau, MD, PhD^{4,5,6}; and Maud Kamal, PhD⁴

Development of high-throughput technologies helped to decipher tumor genomic landscapes revealing actionable molecular alterations. We aimed to rank the level of evidence of recurrent actionable molecular alterations in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) on the basis of the European Society for Medical Oncology (ESMO) Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT) to help the clinicians prioritize treatment. We identified actionable alterations in 33 genes. *HRAS*-activating mutations were ranked in tier IB because of the efficacy of tipifarnib (farnesyltransferase inhibitor) in *HRAS*-mutated patients with HNSCC (nonrandomized clinical trial). Microsatellite instability (MSI), high tumor mutational burden (TMB), and *NTRK* fusions were ranked in tier IC because of PD-1 and TRK tyrosine kinase inhibitors tissue-agnostic approvals. *CDKN2A*-inactivating alterations and *EGFR* amplification were ranked in tier IIA because of the efficacy of palbociclib (CDK4/6 inhibitor) and afatinib (tyrosine kinase inhibitor) in these respective molecular subgroups in retrospective analyses of clinical trials. Molecular alterations in several genes, including *PIK3CA* gene, were ranked in tier IIIA because of clinical benefit in other tumor types, whereas molecular alterations in *IGF1R* and *TP53* genes were ranked in tier IVA and tier V, respectively. The most compelling actionable molecular alterations in HNSCC according to ESCAT include *HRAS*-activating mutations, MSI, high TMB, *NTRK* fusions, *CDKN2A*-inactivating alterations, and *EGFR* amplification.

JCO Precis Oncol 5:215-226. © 2021 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the seventh most common cancer worldwide.¹ HNSCC is often amenable to curative intent with a multimodal approach combining surgery and/or (chemo)radiation when localized to the head and neck region,^{2,3} but its prognosis remains poor in the recurrent and/or metastatic (R/M) setting with a median survival of 14.9 months.⁴ The current treatment strategy is based on tumor location and disease stage and does not take into account the underlying etiology (infection with high-risk human papillomavirus [HPV] or tobacco and alcohol intoxication) of HNSCC,⁵ although HPV has been shown to be associated with a better prognosis.⁶ Pembrolizumab (an antiprogrammed cell death protein 1 [PD-1] immune checkpoint inhibitor) with or without platinum-based chemotherapy has become standard of care in first-line R/M HNSCC.⁴ Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapies, including monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors, have achieved only modest success in R/M HNSCC, illustrating the importance to develop new targeted therapies.⁷

Next-generation sequencing (NGS) technologies led to the identification of several actionable molecular alterations in HNSCC,⁸⁻¹⁰ opening the door of potential new therapeutic options.^{11,12} Overall, a minority of clinical trials have been performed in enriched patient populations for HNSCC.⁷ Importantly, an umbrella biomarker-driven study dedicated to patients with R/M HNSCC was recently launched by the EORTC, in which patients receive different treatments depending on the results of molecular profiling on an on-purpose biopsy of a metastatic site.¹³

Several guidelines have been proposed to prioritize actionable molecular alterations according to their levels of clinical evidence when matched to molecularly targeted agents,¹⁴⁻¹⁸ the latest one being the European Society for Medical Oncology (ESMO) Scale of Actionability of Molecular Targets (ESCAT).¹⁹ Such target prioritization according to ESCAT has been previously reported in patients with breast cancer²⁰ and in patients with any kind of refractory, advanced solid tumor receiving a biomarker-driven treatment in the SHIVA01 trial.^{21,22}

ASSOCIATED CONTENT

Appendix

Author affiliations and support information (if applicable) appear at the end of this article.

Accepted on

December 7, 2020 and published at ascopubs.org/journal/po on January 19, 2021: DOI <https://doi.org/10.1200/P0.20.00280>

CONTEXT

Several guidelines have been proposed to prioritize actionable molecular alterations according to their levels of clinical evidence when matched to molecularly targeted agents, one of them being the European Society for Medical Oncology (ESMO) Scale of Actionability of Molecular Targets (ESCAT).

Key Objective

Does ESCAT classification help physicians to select patients for targeted treatment strategies in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)?

Knowledge Generated

Limited molecular alterations were classified in tiers I and II according to ESCAT in HNSCC. We report six clinically relevant actionable molecular alterations that might effectively be targeted with matched targeted therapy in HNSCC.

Relevance

From a practical perspective, the primary indication for using ESCAT classification in HNSCC is for patients who have failed standard first-line therapies. In this regard, enrollment in clinical trials using drugs matched to molecular alterations should be encouraged.

In the current manuscript, we used ESCAT to rank main actionable molecular alterations in HNSCC with the aim of helping physicians to select patients for targeted treatment strategies.

METHODS

Known actionable molecular alterations reported in HNSCC, including activating mutations, oncogenic fusions, and/or amplifications for oncogenes or deep deletions and inactivating mutations for tumor suppressor genes, were classified into nine different pathways (Table 1). Mutation and copy number alteration frequencies were taken from TCGA using the cBioPortal.²³⁻²⁵

To assess the efficacy of drugs matching specific molecular alterations, we first searched for the results of clinical trials performed in HNSCC in [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov), PubMed, and major scientific meetings (ASCO, ESMO, and AACR). When a clinical trial or related results assessing the efficacy of drug-target match were not available in HNSCC, we searched for clinical trials in other tumor types. In the absence of clinical trials, we searched for preclinical and in silico data. The ranking was performed by two medical oncologists (G.M. and C.L.T.) and validated by one geneticist (I.B.) and a specialist in the field of clinical cancer research (M.K.) until consensus. We ranked molecular alterations in different tiers (I-V and X) according to ESCAT, by assessing the strength of evidence in clinical studies (Appendix Table A1).¹⁹

RESULTS

Molecular Alterations of ESCAT Tiers I and/or II

MAPK pathway. *HRAS* is the most frequently altered gene among the three RAS family members showing activating mutations in HNSCC with a frequency of 6.3% (Table 2). Since the RAS proteins must undergo a post-translational farnesylation to be functional, it has been shown that *HRAS*-activating mutations can be reversed by farnesyltransferase

inhibition.²⁶ Tipifarnib, a potent and highly selective inhibitor of farnesyltransferase, demonstrated high antitumor activity in a phase II study in advanced tumors with *HRAS*-activating mutations.²⁷ At data cutoff, ten out of eighteen patients with evaluable HNSCC (56%) achieved an objective response with a progression-free survival (PFS) of 6.1 months.²⁸ Given that the study was small and not randomized, we classified *HRAS*-activating mutations in tier IB.

DNA repair pathway. Microsatellite instability (MSI) is a hypermutator phenotype that occurs in tumors with impaired somatic or inherited DNA mismatch repair genes, as well as *MLH1* promoter hypermethylation (so-called DNA mismatch repair deficiency [dMMR]). In routine use, detection of MSI is performed by immunohistochemical analysis of MMR proteins or by DNA profiling (two mononucleotide and three dinucleotide microsatellite loci; the so-called Bethesda markers). Colorectal tumors unstable at > 40% of the Bethesda markers are considered MSI-High (MSI-H) accordingly. The incidence of MSI-H in HNSCC has been reported in 1.2% of patients.²⁹ MSI-H tumors display a very large number of mutation-associated neoantigens with increased sensitivity to PD-1 blockade.^{30,31} The antitumor activity of pembrolizumab as single agent against advanced noncolorectal MSI-H/dMMR tumors has been prospectively evaluated across a broad range of solid tumors, including one patient with HNSCC.³² The overall response rate (ORR) was 34.3%, which compares favorably with the earlier reports that led to the accelerated approval of pembrolizumab for MSI-H/dMMR cancers by the FDA in a tissue-agnostic way.³³ We therefore classified MSI-H in tier IC in HNSCC.

Tumor mutational burden. The tumor mutational burden (TMB) has recently emerged as a useful biomarker to select patients for immunotherapy. Around twenty percent of patients with HNSCC had a TMB \geq 10 mutations per megabase (mut/Mb) as measured by the

TABLE 1. Main Actionable Molecular Alterations in HNSCC

Gene	Molecular Alterations	Frequency
Cell cycle and survival pathway		
<i>CCND1</i>	Focal amplifications	23.9%
<i>CDK6</i>	Focal amplifications	5.4%
<i>CDKN2A</i>	Homozygous deletions/known inactivating missense mutations/truncating mutations	53.8%
DNA repair pathway		
<i>TP53</i>	Homozygous deletions/known inactivating missense mutations/truncating mutations	72%
<i>BRCA1</i>	Truncating mutations	0.2%
<i>BRCA2</i>	Homozygous deletions/truncating mutations	2.0%
<i>PALB2</i>	Homozygous deletions/known inactivating missense mutations/truncating mutations	0.2%
<i>POLE</i>	Missense mutations	1.4%
PI3K/AKT/mTOR pathway		
<i>PIK3CA</i>	Amplifications/activating hotspot missense mutations/known activating inframe indels	34.5%
<i>AKT1</i>	Focal amplifications/E17K activating hotspot mutations	1.8%
<i>PTEN</i>	Homozygous deletions/known inactivating missense mutations/truncating mutations	5.6%
<i>STK11</i>	Homozygous deletions/known inactivating missense mutations/truncating mutations	1.4%
Tyrosine kinase receptor pathway		
<i>EGFR</i>	Focal amplifications	10.7%
<i>FGFR1</i>	Focal amplifications	6.9%
<i>FGFR2</i>	Focal amplifications	0.4%
<i>FGFR3</i>	Focal amplifications/activating hotspot missense mutations	1.6%
<i>ERBB2</i>	Focal amplifications/activating hotspot missense mutations	2.2%
<i>ERBB3</i>	Focal amplifications/activating hotspot missense mutations	0.4%
<i>ERBB4</i>	Focal amplifications	0.6%
<i>MET</i>	Focal amplifications	1.0%
<i>IGF1R</i>	Focal amplifications	1.0%
<i>NTRK</i>	Oncogenic fusions	0.2%
Epigenetic pathway		
<i>KMT2C</i>	Homozygous deletions/truncating mutations	5.2%
<i>KMT2D</i>	Homozygous deletions/truncating mutations	12.9%
<i>ARID1A</i>	Homozygous deletions/truncating mutations	1.8%
<i>NSD1</i>	Homozygous deletions/truncating mutations	10.3%
Oxidative stress pathway		
<i>NFE2L2</i>	Focal amplifications/activating hotspot missense mutations	9.0%
<i>KEAP1</i>	Homozygous deletions/known inactivating missense mutations/truncating mutations	2.4%
<i>CUL3</i>	Homozygous deletions/truncating mutations	2.5%
Differentiation		
<i>NOTCH1</i>	Homozygous deletions/known inactivating missense mutations/truncating mutations	11.9%
MAPK pathway		
<i>HRAS</i>	Activating hotspot missense mutations	6.3%
<i>BRAF</i>	Activating V600E hotspot missense mutations	0.2%
<i>NF1</i>	Homozygous deletions/known inactivating missense mutations/truncating mutations	1.0%
Immortalization		
<i>TERT</i>	Focal amplifications/promotor-activating hotspot mutations	7.3%

NOTE. Only known activating mutations, oncogenic fusions, and/or amplifications for oncogenes or homozygous deletions and inactivating mutations for tumor suppressor genes were taken into account. Data retrieved from [ref. 23](#).

Abbreviations: HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; mTOR, mammalian target of rapamycin

TABLE 2. Classification of Molecular Alterations According to ESCAT in HNSCC

Gene	Molecular Alterations	Incidence	ESCAT Tier	References
PI3K/AKT/mTOR pathway				
<i>PIK3CA</i>	Hotspot activating mutations (E542K, E545K/A, and H1047R/L)	8.9%	IIIA	48
	Amplifications	21.6%	IIIB	48
	Other activating hotspot missense mutations	4.0%	IIIB	48
<i>PTEN</i>	Homozygous deletions	3.4%	IIIA	49,50
	Known inactivating missense/truncating mutations	2.2%	IIIA	49,50
MAPK pathway				
<i>HRAS</i>	Hotspot-activating missense mutations	6.3%	IB	27,28
Cell cycle and survival pathway				
<i>CDKN2A</i>	Truncating mutations	17.9%	IIA	36
	Known inactivating missense mutations	3.2%	IIA	36
	Homozygous deletions	32.7%	IIA	36
<i>CCND1</i>	Focal amplifications	23.9%	X	36
<i>CDK6</i>	Focal amplifications	5.4%	X	36
<i>IGF1R</i>	Focal amplifications	1.0%	IVA	76,77
<i>EGFR</i>	Focal amplifications	10.7%	IIA	38,39
<i>ERBB2</i>	Focal amplifications	2.0%	IIIA	57-59
<i>FGFR1</i>	Focal amplifications	6.9%	IIIA	61
<i>FGFR3</i>	Known hotspot activating mutations	1.2%	IIIA	60
<i>MET</i>	Focal amplifications	1.0%	IIIA	68-70
<i>NTRK</i>	Oncogenic fusions	0.2%	IC	42-44
DNA repair pathway				
<i>TP53</i>	Inactivating mutations	72%	V	86-88
<i>BRCA1</i>	Truncating mutations	0.2%	IIIA	71-73
<i>BRCA2</i>	Homozygous deletions/truncating mutations	2.0%	IIIA	71-73
	Microsatellite instability	1.2%	IC	31-33

Abbreviations: ESCAT, ESMO scale for clinical actionability of molecular targets; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; mTOR, mammalian target of rapamycin

MSK-IMPACT–targeted panel.³⁴ In the prespecified exploratory analysis of the Keynote-158 clinical trial across ten different cancer types, 29% of patients with high TMB (defined as ≥ 10 mut/Mb, per the FoundationOne CDx panel) experienced an objective response.³⁵ Given the tissue-agnostic approval of pembrolizumab for patients with TMB-high tumors by the FDA, we ranked TMB-high in tier IC in HNSCC.

Cell cycle pathway. *CDKN2A*-inactivating alterations were reported in 53.8% of patients with HNSCC. Inactivating mutations and homozygous deletions are primarily found in HPV-negative HNSCC as opposed to HPV-positive HNSCC, highlighting distinct molecular properties from HPV-driven HNSCC. Although cell cycle deregulation is ubiquitous in HNSCC, unrestrained cell cycle activation in HPV-negative HNSCC is preferentially driven by P16^{INK4A} inactivation (encoded by *CDKN2A*) and cyclin D1 overexpression (encoded by *CCND1*) that cause hyperactivation of cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6), suggesting that CDK4/6

inhibition may be a rational therapeutic strategy in this setting. Palbociclib, a selective CDK4/6 inhibitor, was evaluated in combination with cetuximab in the PALATINUS trial.³⁶ Overall, 125 patients with HPV-negative R/M HNSCC were randomly assigned to receive palbociclib plus cetuximab or cetuximab plus placebo. Overall survival (OS) was longer in the palbociclib arm than in the placebo arm, although it did not reach statistical significance (9.7 months v 7.8 months, $P = .18$). OS was even longer in the palbociclib arm versus placebo in the subset of patients with detectable *CDKN2A*-inactivating mutations in plasma ctDNA (9.7 months v 4.6 months; hazard ratio [HR], 0.38; 95% CI, 0.14 to 1.06).³⁶ Because this was a retrospective analysis of a molecularly defined subgroup, we classified *CDKN2A*-inactivating alterations in tier IIA.

Tyrosine kinase receptor pathway. *EGFR* is commonly amplified in HNSCC (10.7% of patients). Preclinical evidence for the role of EGFR signaling in regulating key cellular processes, including adhesion, migration,

proliferation, survival, and differentiation, made it a candidate for targeted cancer therapy in HNSCC.³⁷ Afatinib, an oral irreversible pan-HER (EGFR, HER2, and HER4) tyrosine kinase inhibitor, demonstrated efficacy in the LUX-Head and Neck 1 trial.³⁸ Patients with R/M HNSCC who failed platinum therapy were randomly assigned to afatinib or methotrexate. Median progression-free survival was significantly longer in the afatinib arm (2.6 months v 1.7 months, $P = .03$). A retrospective exploratory biomarker analysis showed a significant improvement of median PFS in the subgroup of patients with an *EGFR* amplification, defined as tumors having 50% or more of cells with at least four copies, or a focal amplification of the *EGFR* locus of at least eight copies in one cell or more.³⁹ In this subgroup, the median PFS was 2.8 months in the afatinib arm versus 1.5 months in the methotrexate arm (HR, 0.53; 95% CI, 0.33 to 0.85), compared with 1.6 months in the afatinib arm versus 2.3 months in the methotrexate arm in patients without *EGFR* amplification (HR, 0.98; 95% CI, 0.63 to 1.51).³⁹ We therefore also classified *EGFR* amplification in tier IIA.

NTRK fusions involving *NTRK1*, *NTRK2*, or *NTRK3* (encoding the tropomyosin receptor kinases TRKA, TRKB, and TRKC, respectively) are oncogenic drivers of various adult and pediatric tumor types.⁴⁰ *NTRK* fusions are found at high frequencies (up to or > 90%) in rare cancer types and at low frequencies (commonly < 1%) in a range of other tumor types, including HNSCC.^{41,42} First-generation TRK inhibitors (larotrectinib and entrectinib) have demonstrated durable responses in *NTRK* fusion-positive tumors,^{43,44} leading to the tissue-agnostic drug approvals by the EMA and FDA. Pivotal studies encompassed a broad range of rare tumor types that are known to be enriched for the presence of *TRK* fusions (eg, salivary-gland cancer and sarcoma), but no patients with HNSCC were included. We classified *NTRK* gene fusions in tier IC in HNSCC based on evidence from basket trials.

Molecular Alterations of ESCAT Tier III

PI3K/AKT/mTOR pathway. *PIK3CA*-activating mutations are reported in 12.9% of HNSCC (Table 2). Seventy-three percent of *PIK3CA* mutations occur in the helical and kinase domains that promote activation of the protein. The H1047R/L-, E545K/A-, and E542K-activating mutations represent previously reported canonical mutation sites, similar to that observed in cervical, breast, and lung squamous cell cancers.^{8,45} Clinical trials in R/M HNSCC targeting the PI3K/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway with nonselective mTOR inhibitors and pan-isoform PI3K inhibitors were performed in unselected patient populations, leading to negative results. Conversely, the selective PI3K inhibitor buparlisib was shown to improve OS in combination with paclitaxel in an unselected patient population as well (10.4 months v 6.5 months, $P = .041$).⁴⁶ The outcome of patients treated with buparlisib was not associated with *PIK3CA*-activating mutations in the

retrospective exploratory analysis of the trial.⁴⁷ In patients with metastatic breast cancer, an improved OS was reported in patients with E542K, E545K/A, and H1047R/L hotspot-activating mutations in *PIK3CA* with the alpha-selective PI3K inhibitor apelisib.⁴⁸ We therefore classified E542K, E545K/A, and H1047R/L hotspot-activating mutations in *PIK3CA* in tier IIIA in HNSCC, whereas the other *PIK3CA*-activating alterations (amplifications and other activating missense mutations) were classified in tier IIIB, assuming the same functional impact.

PTEN-inactivating alterations, through inactivating mutations (2.2%), homozygous deletions (3.4%), or down-regulation of expression, result in unrestrained activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Promising anti-tumor activity was reported with the pan-AKT inhibitors capivasertib and ipatasertib in advanced breast and prostate cancers^{49,50} in the subgroup patients with a *PTEN* alteration. We therefore classified *PTEN*-inactivating alterations in tier IIIA in HNSCC.

Tyrosine kinase receptor pathway. *ERBB2* is a member of the *EGFR* family involved in cell proliferation and growth. *ERBB2* and other tyrosine kinase receptors *EGFR*, *ERBB3*, and *ERBB4* initiate signaling via homo- and heterodimerization, resulting in the activation of downstream MAPK, PI3K/AKT, and STAT pathways. *ERBB2* is amplified and/or overexpressed in 15%-30% of breast cancers, 10%-30% of gastric and esophageal cancers, and 2.0% of HNSCC.⁵¹ Lapatinib, a dual *EGFR/ERBB2* tyrosine kinase inhibitor, failed to show a clinical benefit in patients with R/M HNSCC⁵² and in patients with locally advanced disease.⁵³⁻⁵⁵ Dacomitinib, another irreversible pan-HER inhibitor, demonstrated an ORR of 12.7% as first-line treatment in patients with R/M HNSCC.⁵⁶ By contrast, clinical trials demonstrated that targeting *ERBB2* with lapatinib plus trastuzumab and trastuzumab alone leads to OS and PFS improvement in breast and gastroesophageal tumors with *ERBB2* amplifications, respectively.⁵⁷⁻⁵⁹ We therefore classified *ERBB2* amplifications in tier IIIA in HNSCC.

FGFR1 amplifications and *FGFR3*-activating missense mutations were reported in 6.9% and 1.2% of patients with HNSCC, respectively. With the exception of *FGFR3*-activating mutations in urothelial carcinoma,⁶⁰ the *FGFR1*- and *FGFR3*-activating alterations did not predict the efficacy of FGFR inhibitors.⁶¹⁻⁶⁴ By contrast, *FGFR* fusions were found to be strong predictors of response.^{65,66} However, the prevalence of *FGFR3-TACC3* fusions is low in patients with HNSCC (0.7%).⁸ *FGFR3*-activating missense mutations were shown to predict the efficacy of erdafitinib, a potent and FGFR-selective small molecule tyrosine kinase inhibitor, in a prospective, nonrandomized clinical trial in locally advanced or metastatic urothelial carcinoma.⁶⁰ In addition, *FGFR1* amplifications predicted the efficacy of the selective FGFR 1-3 inhibitor infigratinib in squamous cell lung carcinoma in a phase I trial.⁶¹ We therefore classified

FGFR3-activating missense mutations and *FGFR1* amplifications in tier IIIA in HNSCC.

MET amplification is reported in 1.0% of HNSCC.⁸ The c-MET protein is a receptor tyrosine kinase, which is activated by binding to its ligand, the hepatocyte growth factor (HGF). Aberrant signaling of the HGF/c-MET pathway has been identified as a promoter of tumorigenesis and may act as a resistance mechanism against EGFR inhibition in HNSCC.⁶⁷ The ATP-competitive c-MET inhibitor foretinib was tested in unselected R/M HNSCC in a phase II study, with half of the patients (7 of 15) demonstrating a stable disease.⁶⁸ Given the lack of objective response, the study stopped at first interim analysis. In a randomized phase II study, the non-ATP-competitive c-MET inhibitor tivantinib did not improve response rate and survival when combined with cetuximab versus cetuximab alone in cetuximab-naïve R/M HNSCC.⁶⁹ Conversely, durable partial responses to the c-MET inhibitor crizotinib in patients with *MET*-amplified lung cancers have been reported.⁷⁰ Hence, *MET* amplification was classified in tier IIIA for HNSCC.

DNA repair pathway. *BRCA1/2*-inactivating somatic mutations (1.4% of patients with HNSCC) hinder homologous recombination-mediated DNA damage repair. Recent studies in ovarian and breast cancers have demonstrated that inherited and somatic inactivating alterations of *BRCA1/2*, through inactivating mutations and homozygous deletions, predict efficacy to poly-ADP ribose polymerase (PARP)-inhibitors, such as olaparib.⁷¹⁻⁷³ PARP inhibitors are currently under investigation in clinical trials in HNSCC either as single agents or in combination with (chemo)radiotherapy, chemotherapy alone, and in combination with another DNA repair inhibitor targeting *ATR*.⁷ *BRCA1/2*-inactivating somatic mutations were classified in tier IIIA in HNSCC.

There are emerging data on *POLE* mutations in MMR-proficient tumors. Hotspot exonucleasic domain *POLE* (*edPOLE*) mutations generate proofreading defects and cause an extremely hypermutable (or ultramutable) genomic profile.⁷⁴ In the AcSé program, patients with MMR-proficient cancer with pathogenic *edPOLE* mutations derived benefit from nivolumab.⁷⁵ Although *POLE* missense mutations are observed in up to 1.4% of HNSCC tumors, very rare missense mutations (0.2%) within the *POLE* exonucleasic domain have been reported yet.⁸ We classified *edPOLE* mutations in tier IIIA in HNSCC.

Molecular Alterations of ESCAT Tier IV

IGF1R amplification (1% of patients with HNSCC) results in unrestrained activation of the IGF axis, which has been linked to potent antiapoptotic, pro-survival capacities and malignant transformation (Table 2). Additionally, the IGF axis shares common intracellular signaling pathway with EGFR and may mediate resistance to EGFR-targeted therapies. Targeting the IGF axis with monoclonal antibodies figitumumab and cixutumumab has yielded

negative results in phase II trials in HNSCC in unselected patients.^{76,77} In other tumor types (mainly epithelial ovarian cancers), anti-IGF1R targeted agents also lacked efficacy.⁷⁸ The predictive value of *IGF1R* amplification was only observed in preclinical models.⁷⁹ We therefore classified *IGF1R* amplification in tier IVA in HNSCC.

Molecular Alterations of ESCAT Tier V

TP53 is the most commonly mutated gene in HNSCC (72%; Table 2).⁸ The spectrum of *TP53* mutations is wide, including truncating mutations and well-known inactivating missense mutations, in particular, those at codons R248, R273, G245, R175, R282, and H179, which are the most prevalent hotspot mutations occurring within the DNA-binding domain. Regulation of cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence are the main functions of p53 that contribute to its tumor-suppressive role. Disruptive *TP53* mutations are known to be associated with a poor prognosis.⁸⁰ *TP53* mutations may be indicative of decreased sensitivity to cisplatin in HNSCC.^{81,82} Restoration of wild-type p53 functions into tumors leads to p53-mediated apoptosis and senescence in preclinical studies.⁸³⁻⁸⁵ Two p53-reactivating compounds PRIMA-1 and APR-246 have been shown to reactivate mutant forms of p53 irrespective of the *TP53* missense mutation types and to inhibit cell proliferation together with induction of apoptosis.^{86,87} In the phase Ib/II PiSARRO clinical trial,⁸⁸ APR-246 was evaluated in combination with carboplatin and doxorubicin in patients with platinum-sensitive high-grade serous ovarian cancer whose archival tumor specimen demonstrated mutant p53 immunohistochemistry staining. The ORR was 74%. A phase I/II study of APR-246 in combination with pembrolizumab in patients with advanced solid tumors is ongoing (ClinicalTrials.gov identifier: [NCT04383938](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04383938)). Evidence-based clinical data regarding *TP53* actionability are scarce and preliminary. Consequently, we classified *TP53* inactivating mutations in tier V in HNSCC.

Molecular Alterations of ESCAT Tier X

CCND1 and *CDK6* amplifications (cell cycle and survival pathway) are reported in 23.9% and 5.4% of patients with HNSCC, respectively (Table 2). Combined exploratory biomarker analyses from PALATINUS reported no differential benefit for the CDK4/6 inhibitor palbociclib in *CCND1*- and *CDK6*-amplified tumors.³⁶ We therefore classified *CCND1* and *CDK6* amplifications in tier X.

DISCUSSION

Limited molecular alterations were classified in tiers I and II according to ESCAT in HNSCC. *HRAS*-activating mutations were classified in tier IB because of the efficacy of tipifarnib in patients with *HRAS*-mutated HNSCC. MSI, high TMB, and *NTRK* fusions were ranked in tier IC because of the tissue-agnostic FDA approval of PD-1 inhibitors and TRK tyrosine kinase inhibitors larotrectinib and entrectinib. *CDKN2A*-inactivating alterations and *EGFR* amplifications were ranked in tier IIA because of the efficacy of palbociclib

and afatinib in these respective molecular subgroups in retrospective analyses of clinical trials. Alterations in the *PIK3CA*, *PTEN*, *ERBB2*, *FGFR1*, *FGFR3*, *BRCA1*, *BRCA2*, *EDPOLE*, and *MET* genes were ranked in tier IIIA because of clinical benefit demonstrated in other tumor types, whereas molecular alterations in *IGF1R* and *TP53* genes were ranked in tier IVA and tier V, respectively, on the basis of solely preclinical evidence. *CCND1* and *CDK6* amplifications were ranked in tier X given the lack of clinical and preclinical evidence. Because ESCAT relies on published preclinical and clinical data, the distribution in the different tiers will certainly evolve with time.

Most actionable molecular alterations in HNSCC were shown to improve outcomes in other tumor types than HNSCC. A small number of unvalidated molecular events with a similar predicted functional impact (eg, amplifications v activating mutations in oncogenes) were also reported and ranked in tier IIIB accordingly. Unvalidated molecular events must be considered carefully, given a worse outcome in the ESCAT IIIB subgroup of patients treated with matched targeted therapies in SHIVA01.²²

Limitations of this study include interindividual variability of the literature review. In an attempt to limit this variability, the classification was validated by several experts. Additionally, this study did not take into account targeted therapies for which predictive biomarkers of efficacy are not yet identified. Despite an OS benefit in randomized trials in HNSCC,^{89,90} cetuximab was excluded from the classification, since *EGFR* amplifications were not shown to predict the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy.⁹¹

From a practical perspective, we must acknowledge that the primary indication for using this classification is for patients who have failed standard first-line therapies. Most of these agents mentioned do not have any approved indication for HNSCC. In this regard, enrollment in clinical trials using drugs matched to genomics should be encouraged, since precision medicine programs have been shown to improve outcomes.^{92,93} Recently, ESMO published guidelines for the use of NGS in metastatic tumors.⁹⁴ Given the high prevalence of molecular alterations ranked in tiers II-IV, NGS may be relevant in advanced recurrent and/or metastatic HNSCC in the context of molecular screening programs.

Beside inherent limitations of ESCAT, several reasons may hinder the more extensive use of targeted therapy toward histology-agnostic cancer treatment in clinical practice

among which targeted therapies' affinity for a specific target and tumor heterogeneity. The latter is especially known to be a major issue for precision medicine. Indeed, tumor molecular profiling-based strategy is largely derived from samples collected at a single time point. Several reports actually revealed the evolutionary dynamics of the cancer genome⁹⁵ and the striking heterogeneity in tumors.^{96,97} A new microenvironmental selective pressure through the application of targeted therapy may mean that particular mutations within the reservoir of pre-existing variants could suddenly become adaptive and so increase in frequency.⁹⁸ In the clinical setting, tumor heterogeneity could explain the confusing responses to targeted therapy, highlighting the importance of a representative biopsy for molecular analyses. The presence of coexisting molecular alterations may explain disappointing efficacy of matched targeted therapies given as single agents. Treatment prioritization of coexisting molecular alterations is not clearly detailed in ESCAT classification, nor the integration of resistance alterations. The I-PREDICT precision medicine trial took into account several actionable molecular alterations to suggest drug combinations for patients, including potential biomarkers of efficacy of immunotherapy (eg, TMB and MSI).⁹⁹ The efficacy results were concordant with what had been reported to date^{92,100,101} and suggested that outcomes were improved when a larger fraction of identified molecular alterations could be targeted with drugs. Since multidrug combinations were feasible and safe, the current trial paradigm for precision oncology with scripted single agents may be optimized by treating coexisting alterations with customized combination therapies when feasible.

In conclusion, we described here six clinically relevant actionable molecular alterations that might effectively be targeted with matched targeted therapy in HNSCC. We would argue that our classification should be applied in sequencing reports and tumor boards not to miss patients harboring targetable genetic alterations, as well as over-interpretation of hypothetical targets. Beside inherent limitations of the ESCAT, several issues need to be considered in the context of precision medicine, including the challenges of tumor heterogeneity and the emergence of resistance mechanisms. Overall, the development and updating of such classification to translate molecular findings to clinical benefit is critical for successful implementation of precision and personalized cancer medicine.

AFFILIATIONS

¹Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

²Department of Genetics, Institut Curie, Paris Descartes University, Paris, France

³INSERM U1016 Research Unit, Cochin Institute, Paris, France

⁴Department of Drug Development and Innovation (D3i), Institut Curie, Paris & Saint-Cloud, France

⁵INSERM U900, Institut Curie, Mines Paris Tech, Saint-Cloud, France

⁶Paris-Saclay University, Paris, France

CORRESPONDING AUTHOR

Maud Kamal, PhD, Department of Drug Development and Innovation (D3i), Institut Curie, 26 Rue d'Ulm, 75005 Paris, France; e-mail: maud.kamal@curie.fr.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: Ivan Bièche, Patricia Tresca, Delphine Loirat, Maxime Frelaut, Christophe Le Tourneau, Maud Kamal

Administrative support: Célia Dupain

Provision of study materials or patients: Patricia Tresca, Coraline Dubot

Collection and assembly of data: Grégoire Marret, Célia Dupain, Coraline Dubot, Delphine Loirat, Maud Kamal

Data analysis and interpretation: Grégoire Marret, Ivan Bièche, Edith Borcoman, Pauline du Rusquec, Francesco Ricci, Ségolène Hescot, Marie-Paule Sablin, Diana Bello, Delphine Loirat, Charlotte Lecerf, Christophe Le Tourneau, Maud Kamal

Manuscript writing: All authors

Final approval of manuscript: All authors

Accountable for all aspects of the work: All authors

Open Payments is a public database containing information reported by companies about payments made to US-licensed physicians ([Open Payments](#)).

Edith Borcoman

Travel, Accommodations, Expenses: MSD, Amgen

Marie-Paule Sablin

Honoraria: Servier

(OPTIONAL) Uncompensated Relationships: Roche/Genentech

Delphine Loirat

Consulting or Advisory Role: Roche, MSD Oncology, Bristol-Myers Squibb, AstraZeneca, Novartis, Pfizer, Immunomedics

Expert Testimony: Amgen, Roche

Travel, Accommodations, Expenses: Roche, AstraZeneca, MSD, Pfizer

Christophe Le Tourneau

Honoraria: Novartis, Bristol-Myers Squibb, MSD, Merck Serono, Roche, Nanobiotix, GlaxoSmithKline, Celgene, Rakuten Medical

Consulting or Advisory Role: Amgen, MSD, Bristol-Myers Squibb, Merck Serono, AstraZeneca, Nanobiotix, GlaxoSmithKline, Roche, AstraZeneca

Travel, Accommodations, Expenses: MSD, Bristol-Myers Squibb, AstraZeneca

No other potential conflicts of interest were reported.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The following represents disclosure information provided by authors of this manuscript. All relationships are considered compensated unless otherwise noted. Relationships are self-held unless noted. I = Immediate Family Member, Inst = My Institution. Relationships may not relate to the subject matter of this manuscript. For more information about ASCO's conflict of interest policy, please refer to www.asco.org/rwc or ascopubs.org/cci/author-center.

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al: Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359-E386, 2015
2. Seiwert TY, Cohen EEW: State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *Br J Cancer* 92:1341-1348, 2005
3. Marur S, Forastiere AA: Head and neck cancer: Changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 83:489-501, 2008
4. Burtneff B, Harrington KJ, Greil R, et al: Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): A randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 394:1915-1928, 2019
5. Colevas AD, Yom SS, Pfister DG, et al: NCCN guidelines insights: Head and neck cancers, version 1.2018. *J Natl Compr Canc Netw* 16:479-490, 2018
6. Fakhry C, Westra WH, Li S, et al: Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100:261-269, 2008
7. Gougis P, Moreau Bachelard C, Kamal M, et al: Clinical development of molecular targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *JNCI Cancer Spectrum* 3:pkz055, 2019
8. Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 517:576-582, 2015
9. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, et al: The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 333:1157-1160, 2011
10. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, et al: Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 333:1154-1157, 2011
11. Tannock IF, Hickman JA: Limits to personalized cancer medicine. *N Engl J Med* 375:1289-1294, 2016
12. Marketing personalized cancer treatments requires careful language. *Nature* 558:5-6, 2018
13. Galot R, Le Tourneau C, Guigay J, et al: Personalized biomarker-based treatment strategy for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: EORTC position and approach. *Ann Oncol* 29:2313-2327, 2018
14. Andre F, Mardis E, Salm M, et al: Prioritizing targets for precision cancer medicine. *Ann Oncol* 25:2295-2303, 2014
15. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al: Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: A joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 19:4-23, 2017
16. Meric-Bernstam F, Johnson A, Holla V, et al: A decision support framework for genomically informed investigational cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 107:djv098, 2015
17. Van Allen EM, Wagie N, Stojanov P, et al: Whole-exome sequencing and clinical interpretation of formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples to guide precision cancer medicine. *Nat Med* 20:682-688, 2014
18. Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, et al: OncoKB: A precision oncology knowledge base. *JCO Precis Oncol* 2017, 2017
19. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, et al: A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: The ESMO scale for clinical actionability of molecular targets (ESCAT). *Ann Oncol* 29:1895-1902, 2018
20. Condorelli R, Mosele F, Verret B, et al: Genomic alterations in breast cancer: Level of evidence for actionability according to ESMO scale for clinical actionability of molecular targets (ESCAT). *Ann Oncol* 30:365-373, 2019
21. Le Tourneau C, Delord JP, Gonçalves A, et al: Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): A multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol* 16:1324-1334, 2015
22. Moreira A, Maslah-Planchon J, Callens C, et al: Efficacy of molecularly targeted agents given in the randomised trial SHIVA01 according to the ESMO scale for clinical actionability of molecular targets. *Eur J Cancer* 121:202-209, 2019
23. cBioPortal for Cancer Genomics: <https://www.cbioportal.org/>

24. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al: The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2:401-404, 2012
25. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al: Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6:pl1, 2013
26. Chen X, Makarewicz JM, Knauf JA, et al: Transformation by Hras(G12V) is consistently associated with mutant allele copy gains and is reversed by farnesyl transferase inhibition. *Oncogene* 33:5442-5449, 2014
27. Ho AL, Chau N, Bauman J, et al: Preliminary results from a phase II trial of tipifarnib in squamous cell carcinomas (SCCs) with HRAS mutations. *Ann Oncol* 29:viii373, 2018
28. Ho AL, Hanna GJ, Scholz CR, et al: Preliminary activity of tipifarnib in tumors of the head and neck, salivary gland and urothelial tract with HRAS mutations. *J Clin Oncol* 38, 2020 (suppl 15; abstr 6504)
29. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park WY, et al: A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun* 8:15180, 2017
30. Le DT, Uram JN, Wang H, et al: PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 372:2509-2520, 2015
31. Le DT, Durham JN, Smith KN, et al: Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357:409-413, 2017
32. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, et al: Efficacy of pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/mismatch repair-deficient cancer: Results from the phase II KEYNOTE-158 study. *JCO* 38:1-10, 2019
33. Pembrolizumab Package Insert: https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/k/keytruda/keytruda_pi.pdf
34. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, et al: Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet* 51:202-206, 2019
35. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, et al: Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: Prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol* 21:1353-1365, 2020
36. Adkins D, Lin JC, Sacco AG, et al: Palbociclib plus cetuximab versus placebo plus cetuximab in platinum-resistant, cetuximab-naive, HPV-unrelated head and neck cancer: A double-blind randomized phase II trial (PALATINUS). *J Clin Oncol* 37, 2019 (suppl 15; abstr 6013)
37. Bazley LA, Gullick WJ: The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 12:S17-S27, 2005 (suppl 1)
38. Machiels JPH, Haddad RI, Fayette J, et al: Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): An open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:583-594
39. Cohen EEW, Licitra LF, Burtneess B, et al: Biomarkers predict enhanced clinical outcomes with afatinib versus methotrexate in patients with second-line recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol* 28:2526-2532, 2017
40. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A: NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 15:731-747, 2018
41. Zehir A, Benayed R, Shah RH, et al: Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 23:703-713, 2017
42. Stransky N, Cerami E, Schalm S, et al: The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun* 5:4846, 2014
43. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, et al: Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N Engl J Med* 378:731-739, 2018
44. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, et al: Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: Integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol* 21:271-282, 2020
45. Lui WY, Hedberg ML, Li H, et al: Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov* 3:761-769, 2013
46. Soulières D, Faivre S, Mesia R, et al: Buparlisib and paclitaxel in patients with platinum-pretreated recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (BERIL-1): A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol* 18:323-335, 2017
47. Soulières D, Licitra L, Mesia R, et al: Molecular alterations and buparlisib efficacy in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: Biomarker analysis from BERIL-1. *Clin Cancer Res* 24:2505-2516, 2018
48. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, et al: Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 380:1929-1940, 2019
49. Schmid P, Abraham J, Chan S, et al: AZD5363 plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (PAKT): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase II trial. *J Clin Oncol* 36, 2018 (suppl 15; abstr 1007)
50. de Bono JS, De Giorgi U, Rodrigues DN, et al: Randomized phase II study evaluating Akt blockade with ipatasertib, in combination with Abiraterone, in patients with metastatic prostate cancer with and without PTEN loss. *Clin Cancer Res* 25:928-936, 2019
51. Iqbal N, Iqbal N: Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: Overexpression and therapeutic implications. *Mol Biol Int* 2014:852748, 2014
52. de Souza JA, Davis DW, Zhang Y, et al: A phase II study of lapatinib in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 18:2336-2343, 2012
53. Del Campo JM, Hitt R, Sebastian P, et al: Effects of lapatinib monotherapy: Results of a randomised phase II study in therapy-naive patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 105:618-627, 2011
54. Harrington K, Berrier A, Robinson M, et al: Randomised phase II study of oral lapatinib combined with chemoradiotherapy in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: Rationale for future randomised trials in human papilloma virus-negative disease. *Eur J Cancer* 49:1609-1618, 2013
55. Harrington KJ, Temam S, D'Cruz A, et al: Final analysis: A randomized, blinded, placebo (P)-controlled phase III study of adjuvant postoperative lapatinib (L) with concurrent chemotherapy and radiation therapy (CH-RT) in high-risk patients with squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *J Clin Oncol* 32, 2014 (suppl 15; abstr 6005)
56. Abdul Razak AR, Soulières D, Laurie SA, et al: A phase II trial of dacomitinib, an oral pan-human EGF receptor (HER) inhibitor, as first-line treatment in recurrent and/or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* 24:761-769, 2013
57. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al: Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673-1684, 2005
58. Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, et al: Overall survival benefit with lapatinib in combination with trastuzumab for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: Final results from the EGF104900 study. *J Clin Oncol* 30:2585-2592, 2012
59. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): A phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376:687-697, 2010
60. Loriot Y, Necchi A, Park SH, et al: Erdafitinib in locally advanced or metastatic urothelial carcinoma. *N Engl J Med* 381:338-348, 2019

61. Nogova L, Sequist LV, Perez Garcia JM, et al: Evaluation of BGJ398, a Fibroblast growth factor receptor 1-3 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors harboring genetic alterations in Fibroblast growth factor receptors: Results of a global phase I, dose-escalation and dose-expansion study. *J Clin Oncol* 35:157-165, 2017
62. Taberero J, Bahleda R, Dienstmann R, et al: Phase I dose-escalation study of JNJ-42756493, an oral pan-fibroblast growth factor receptor inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 33:3401-3408, 2015
63. Göke F, Franzen A, Hinz TK, et al: FGFR1 expression levels predict BGJ398 sensitivity of FGFR1-dependent head and neck squamous cell cancers. *Clin Cancer Res* 21:4356-4364, 2015
64. Rooney C, Geh C, Williams V, et al: Characterization of FGFR1 locus in sqNSCLC reveals a broad and heterogeneous Amplicon. *PLoS One* 11:e0149628, 2016
65. Javle M, Lowery M, Shroff RT, et al: Phase II study of BGJ398 in patients with FGFR-altered advanced cholangiocarcinoma. *J Clin Oncol* 36:276-282, 2018
66. Chae YK, Vaklavas C, Cheng HH, et al: Molecular analysis for therapy choice (MATCH) arm W: Phase II study of AZD4547 in patients with tumors with aberrations in the FGFR pathway. *J Clin Oncol* 36, 2018(suppl 15; abstr 2503)
67. Rothenberger NJ, Stabile LP: Hepatocyte growth factor/c-Met signaling in head and neck cancer and implications for treatment. *Cancers (Basel)* 9:39, 2017
68. Seiwert T, Sarantopoulos J, Kallender H, et al: Phase II trial of single-agent foretinib (GSK1363089) in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Invest New Drugs* 31:417-424, 2013
69. Vokes EE, Worden FP, Adkins D, et al: A randomized phase II trial of the MET inhibitor tivantinib + cetuximab versus cetuximab alone in patients with recurrent/metastatic head and neck cancer. *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl 15; abstr 6060)
70. Camidge DR, Ou SHI, Shapiro G, et al: Efficacy and safety of crizotinib in patients with advanced c-MET-amplified non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 32, 2014 (suppl 15; abstr 8001)
71. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, et al: Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18:1274-1284, 2017
72. Moore K, Colombo N, Scambia G, et al: Maintenance Olaparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer. *N Engl J Med* 379:2495-2505, 2018
73. Robson ME, Tung N, Conte P, et al: OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 30:558-566, 2019
74. Campbell BB, Light N, Fabrizio D, et al: Comprehensive analysis of hypermutation in human cancer. *Cell* 171:1042-1056.e10, 2017
75. Rousseau BJC, Bieche I, Pasmant E, et al: 5260 High activity of nivolumab in patients with pathogenic exonuclease domain POLE (edPOLE) mutated Mismatch Repair proficient (MMRp) advanced tumours. *Ann Oncol* 31:S463, 2020
76. Schmitz S, Kaminsky-Forreth MC, Henry S, et al: Phase II study of figitumumab in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: Clinical activity and molecular response (GORTEC 2008-02). *Ann Oncol* 23:2153-2161, 2012
77. Ferrarotto R, William WN, Tseng JE, et al: Randomized phase II trial of cixutumumab alone or with cetuximab for refractory recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 82:83-90, 2018
78. Werner H, Sarfstein R, Bruchim I: Investigational IGF1R inhibitors in early stage clinical trials for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 28:1101-1112, 2019
79. Barnes CJ, Ohshiro K, Rayala SK, et al: Insulin-like growth factor receptor as a therapeutic target in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 13:4291-4299, 2007
80. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, et al: TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 357:2552-2561, 2007
81. Perrone F, Bossi P, Cortelazzi B, et al: TP53 mutations and pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin and fluorouracil chemotherapy in resected oral cavity squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 28:761-766, 2010
82. Osman AA, Neskey DM, Katsonis P, et al: Evolutionary action score of TP53 coding variants is predictive of platinum response in head and neck cancer patients. *Cancer Res* 75:1205-1215, 2015
83. Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI: Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 127:1323-1334, 2006
84. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, et al: Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445:661-665, 2007
85. Harajly M, Zalzali H, Nawaz Z, et al: p53 restoration in induction and maintenance of senescence: Differential effects in premalignant and malignant tumor cells. *Mol Cell Biol* 36:438-451, 2016
86. Bykov VJN, Issaeva N, Shilov A, et al: Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* 8:282-288, 2002
87. Bykov VJN, Zache N, Stridh H, et al: PRIMA-1(MET) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene* 24:3484-3491, 2005
88. Gourley C, Green J, Gabra H, et al: PISARRO: A EUTROC phase Ib study of APR-246 in combination with carboplatin (C) and pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in platinum sensitive relapsed high grade serous ovarian cancer (HGSOC). *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl 15; abstr 5571)
89. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al: Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359:1116-1127, 2008
90. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354:567-578, 2006
91. Licitra L, Mesia R, Rivera F, et al: Evaluation of EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the efficacy of cetuximab in combination with chemotherapy in the first-line treatment of recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: EXTREME study. *Ann Oncol* 22:1078-1087, 2011
92. Tsimberidou AM, Iskander NG, Hong DS, et al: Personalized medicine in a phase I clinical trials program: The MD Anderson cancer center initiative. *Clin Cancer Res* 18:6373-6383, 2012
93. Tsimberidou AM, Hong DS, Ye Y, et al: Initiative for molecular profiling and advanced cancer therapy (IMPACT): An MD Anderson precision medicine study. *JCO Precision Oncol*, 2017
94. Mosele F, Remon J, Mateo J, et al: Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: A report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol* 31:1491-1505, 2020
95. Graham TA, Sottoriva A: Measuring cancer evolution from the genome. *J Pathol* 241:183-191, 2017
96. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al: Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366:883-892, 2012
97. Meacham CE, Morrison SJ: Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501:328-337, 2013
98. Diaz LA, Williams RT, Wu J, et al: The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 486:537-540, 2012
99. Sicklick JK, Kato S, Okamura R, et al: Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: The I-PREDICT study. *Nat Med* 25:744-750, 2019

100. Von Hoff DD, Stephenson JJ, Rosen P, et al: Pilot study using molecular profiling of patients' tumors to find potential targets and select treatments for their refractory cancers. *J Clin Oncol* 28:4877-4883, 2010
 101. Massard C, Michiels S, Féré C, et al: High-throughput genomics and clinical outcome in hard-to-treat advanced cancers: Results of the MOSCATO 01 trial. *Cancer Discov* 7:586-595, 2017
-

APPENDIX

TABLE A1. ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT)

ESCAT Evidence Tier	Level of Evidence A	Level of Evidence B	Level of Evidence C	Clinical Implications
Tier I				
Drug-target match associated with improved outcome in clinical trials	Improvement of survival end points in prospective, randomized clinical trials	Clinically meaningful benefit in prospective, nonrandomized clinical trials	Clinically meaningful benefit in multiple tumor types and basket clinical trials	Alterations suitable for routine use
Tier II				
Drug-target match associated with antitumor activity, but magnitude of benefit is unknown	Clinically meaningful benefit in retrospective exploratory analyses of prospective trials	Higher tumor response rates in prospective clinical trials		Investigational alterations that need further investigation before incorporating to routine care
Tier III				
Drug-target match associated with limited clinical evidence of actionability	Clinical benefit solely demonstrated in other tumor types	Clinical benefit solely demonstrated for similar molecular alterations		Hypothetical alterations that represent an ideal setting for prospective studies
Tier IV				
Drug-target match associated with preclinical evidence of actionability	Actionability predicted in preclinical in vitro or in vivo models	Actionability predicted in silico		Hypothetical alterations that may be appropriate for enrichment of patients in early-phase clinical trials
Tier V				
Drug-target match associated with objective responses, but without clinically meaningful benefit				Evidence supporting cotargeting approaches
Tier X				
Lack of evidence for actionability				Alterations that should not be taken into account for clinical decisions

Abbreviations: EMSO, European Society for Medical Oncology; ESCAT, ESMO scale for clinical actionability of molecular targets.

Adapted from [ref. 19](#).

4.1.2 Article #4 *Window-of-opportunity clinical trials for biomarker discovery in head and neck squamous cell carcinoma*



Window-of-opportunity clinical trials for biomarker discovery in head and neck squamous cell carcinoma

Grégoire Marret^a, Edith Borcoman^a and Christophe Le Tourneau^{a,b}

Purpose of review

We review the window-of-opportunity clinical trials that have been reported in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), and discuss their challenges.

Recent findings

Limited treatment options exist in HNSCC. Cetuximab, an mAb targeting epidermal growth factor receptor, and the PD-1 inhibitors nivolumab and pembrolizumab, are the only drugs that improved overall survival in the recurrent and/or metastatic setting. Both cetuximab and nivolumab improve overall survival by less than 3 months, potentially because of the lack of predictive biomarkers. The only validated predictive biomarker to date is protein ligand PD-L1 expression that predicts the efficacy of pembrolizumab in first-line, nonplatinum refractory recurrent and/or metastatic HNSCC. The identification of biomarkers of efficacy of new drugs is key to avoid administering toxic drugs to patients who will not benefit from them, and to expect increased drug efficacy in the biomarker-positive group of patients. One way of identifying such biomarkers are the window-of-opportunity trials in which drugs are given for a short period of time before the definitive treatment, with the aim to collect samples for translational research. These trials differ from neoadjuvant strategies where efficacy is the primary endpoint.

Summary

We show that these trials were safe and successful in identifying biomarkers.

Keywords

biomarker, clinical trials, head and neck squamous cell carcinoma, predictive, window-of-opportunity

INTRODUCTION

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the seventh most common cancer worldwide [1]. The current standard of care for locoregionally advanced HNSCC includes upfront surgery with adjuvant (chemo)radiotherapy, or definitive (chemo)radiotherapy [2]. Despite this multimodal therapeutic approach, around 50% of locally advanced HNSCC patients recur after primary treatment, at the locoregional level and/or with distant metastases [3]. Patients who are not amenable to local treatments have a dismal prognosis (i.e., 6–9 months in the absence of treatment) [4].

In head and neck oncology, cetuximab that targets epidermal growth factor receptor (EGFR) is the only approved targeted therapy. Cetuximab demonstrated a survival benefit, both in the locally advanced setting in combination with radiotherapy [5] and in the first-line recurrent and/or metastatic setting in combination with chemotherapy [6], yet without prior patients' selection. Immune

checkpoint inhibitors (ICIs) have been evaluated in recurrent and/or metastatic HNSCC with two PD-1 inhibitors (nivolumab and pembrolizumab) recently approved by the FDA and EMA [7–9]. Nivolumab as single-agent is approved regardless of PD-L1 expression in platinum-refractory disease. Pembrolizumab in combination with platinum and 5-FU and pembrolizumab alone are two approved regimens in first-line nonplatinum refractory disease, depending on PD-L1 expression on both tumor cells and inflammatory cells.

^aDepartment of Drug Development and Innovation (D3i), Institut Curie and ^bINSERM U900, Institut Curie, Paris-Saclay University, Paris, France

Correspondence to Christophe Le Tourneau, MD, PhD, Department of Drug Development and Innovation (D3i), Institut Curie, 26 Rue d'Ulm, 75005 Paris, France. Tel: +33 1 4432 4675; fax: +33 1 5310 4006; e-mail: christophe.letourneau@curie.fr

Curr Opin Oncol 2023, 35:158–165

DOI:10.1097/CCO.0000000000000940

KEY POINTS

- Window-of-opportunity clinical trials are challenging to conduct.
- They mandate a close collaboration between medical oncologists and surgeons.
- Window-of-opportunity clinical trials are safe.
- These trials represent a powerful tool for biomarkers' identification.
- None of the identified biomarkers were further validated in the recurrent or metastatic setting.

Recent targeted therapies and ICIs in HNSCC have been explored in the recurrent and/or metastatic setting in heavily pretreated patients that challenges the evaluation of drugs' benefit, and limits the assessment of biomarkers of efficacy of new drugs [10]. By leveraging the time lapse for preoperative workup and planning in operable HNSCC patients, window-of-opportunity clinical trials investigate new drugs in treatment-naïve patients with widely available tumor samples obtained at diagnosis and after drug exposure, with the aim to identify predictive and/or pharmacodynamic biomarkers of efficacy. These trials differ from neoadjuvant strategies where efficacy is the primary endpoint.

In this article, we aimed to discuss the rationale for window-of-opportunity clinical trials, their challenges and their potential limitations, and to review the ones reported in HNSCC.

RATIONALE FOR WINDOW-OF-OPPORTUNITY CLINICAL TRIALS

Window-of-opportunity clinical trials refer to innovative clinical trials where drugs are given in a short timeframe before a definitive treatment with the aim to explore the safety, pharmacodynamics, short-term efficacy, and predictive biomarkers for investigational drugs, and without delaying standard of care therapy. Conversely, in neoadjuvant trials, drugs are commonly given for a longer period of time with the primary objective of inducing tumor shrinkage for efficacy purposes [10]. Some recent neoadjuvant immunotherapy trials with an efficacy endpoint, however, can also be considered as window-of-opportunity trials since they were given for a short period of time and did not preclude or delay the planned definitive treatment.

Several windows for window-of-opportunity trials exist including the preoperative setting before surgery of a primary cancer or a metastasis, before a

radiation-based therapy, or even before neoadjuvant chemotherapy. The most frequently used window is the preoperative setting. This latter setting is ideal for several reasons. First, tumor samples are easily available for translational studies, given the necessity of an initial biopsy for pathologic confirmation of the diagnosis and subsequent curative therapy. Likewise, posttreatment samples that are essential to identify pharmacodynamic biomarkers, are obviously easy to collect from the surgical specimen. Second, tumors at this stage have less molecular alterations including secondary resistance mechanisms to treatment in comparison with tumors from heavily pretreated patients, since they were not exposed to prior treatments.

CHALLENGES AND POTENTIAL LIMITATIONS

Since the primary objective of window-of-opportunity clinical trials is not efficacy, one must ensure that the participation of patients in these trials does not jeopardize the efficacy of the definitive treatment. For this reason, these trials are difficult to conduct (Table 1). First, drug exposure during the window needs to be long enough to provide biological activity, but without delaying the definitive treatment. The preoperative setting therefore mandates a tight and daily collaboration between medical oncologists and surgeons, so that patients can be included and treated before the planned date of surgery. Second, drugs being evaluated might induce toxicity. The toxicity profile of drugs must be favorable and preferentially known in the tumor type of interest. Drug safety should have previously been evaluated in the recurrent and/or metastatic setting. Third, the drugs under evaluation, although given for a short period of time, might still produce antitumor activity. Tumor shrinkage might therefore lead to a surgical plan change or a down-staging of the tumor. Both situations might result in subsequent under-treatment [11]. The last challenge is the study design. Sample size calculation might be delicate in these biomarker-finding trials without necessarily any relevant putative biomarker that would help setting the null and the alternative hypotheses. A placebo or a no treatment arm is highly wished, since controlled experimental conditions allow to investigate biomarkers with an increased statistical power, but reinforces the necessity not to delay the definitive treatment.

Inclusion of patients in these window-of-opportunity clinical trials is challenging, in particular for patients with curable disease, for several reasons. First, almost concomitantly with the announce of a diagnosis of cancer and a proposition of a

Table 1. Challenges of window-of-opportunities clinical trials

Challenges	Consequences
Potential inefficacy of the drug	The definitive treatment must not be delayed
Potential toxicity of the drug	The toxicity profile of the drug must be known, preferentially in the tumor type under investigation
Potential efficacy of the drug	The definitive treatment plan should not be changed. This might also lead to tumor down-staging
Potential pseudoprogression during immunotherapy	May complicate image interpretation. This must be distinguished from hyperprogression
Randomization vs. placebo or no treatment	The treatment must not be delayed. This might decrease patients' acceptance to participate
Sample size calculation	Difficulty to choose a relevant putative biomarker and to set the statistical hypotheses

treatment that is often heavy [i.e., head and neck surgery and/or (chemo)radiotherapy], patients are being proposed to participate in a clinical trial in which the primary objective is not efficacy. In addition, the participation in the trial often mandates additional imaging, blood sampling and tumor biopsies. Finally, all potential adverse events disclosed in the consent form might frighten patients. The likelihood that a patient will participate in such trials is clearly proportional to the motivation of the physician who announces the diagnosis and the treatment plan (the surgeon most of the time).

More recently, neoadjuvant immunotherapy trials have led to immune-related safety concerns, as well as potential limitations of imaging criteria for response assessment. The pseudoprogression phenomenon [12], an initial tumor flare related to inflammatory processes, may erroneously be construed as tumor growth and disease progression during the short timeframe of a preoperative window [13,14]. In a small minority of patients, ICIs can lead to hyperprogression [15], a phenomenon of tumor growth under treatment which may delay or even hamper the definitive treatment.

WINDOW-OF-OPPORTUNITY CLINICAL TRIALS INVESTIGATING TARGETED THERAPIES IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Next-generation sequencing technologies have identified a number of actionable molecular alterations in HNSCC [16], opening the door of potential targeted drugs which can be studied through window-of-opportunity clinical trials. Because most HNSCC highly express EGFR on the surface of tumor cells (~90%) [17,18], therapies targeting EGFR [both monoclonal antibodies (mAbs) and tyrosine kinase inhibitors (TKIs)] have been extensively evaluated in this disease. Over the last decade, we identified 11 window-of-opportunity clinical trials evaluating mostly EGFR inhibitors as monotherapy [19–24] or in combination with COX [25] and Src inhibitors

[26], but also MEK1/2 inhibitor [27], mTOR inhibitor [28], and metabolic modulator [29] (Table 2).

Most of these evaluated drugs were either previously approved in recurrent and/or metastatic HNSCC (i.e., the mAb cetuximab) [6,30,31], or had shown antitumor activity in the recurrent and/or metastatic setting (i.e., the irreversible pan-ErbB inhibitor afatinib) [32,33]. First-generation reversible EGFR/HER2 TKIs, including erlotinib and lapatinib, demonstrated modest clinical activity as monotherapy in recurrent and/or metastatic HNSCC [34,35]. In contrast, the other investigational drugs, including inhibitors of COX, MEK1/2, Src, and mTOR, were evaluated in a window-of-opportunity clinical trial although no antitumor activity had been reported in HNSCC.

Sulindac, a nonselective COX inhibitor, was evaluated in combination with erlotinib since concurrent EGFR-COX targeting demonstrated therapeutic synergism in HNSCC cell lines and xenograft models [36]. Dasatinib, a small molecule inhibitor of Src family kinases, was evaluated as a single-agent although no clinical activity had been reported in recurrent and/or metastatic HNSCC [37]. Trametinib, an allosteric MEK1/2 inhibitor, was evaluated on the basis of preclinical data derived from carcinogen-induced mouse models of oral cavity tumors which showed increased phosphorylated ERK1/2 [38]. Rapamycin, a mTOR inhibitor, was evaluated on the basis of sustain aberrant PI3K/mTOR pathway activation in HNSCC [39,40]. Preclinical data derived from genetically defined and chemically induced HNSCC models also showed that mTOR inhibition-induced tumor regression [41].

Ongoing window-of-opportunity clinical trials without published results include the WISTERIA study (NCT03028766) evaluating the WEE1 kinase inhibitor adavosertib in combination with cisplatin, and a randomized trial (NCT03022409) investigating DNA damage repair agents (the PARP inhibitor olaparib and the selective ATR inhibitor ceralasertib).

Five out of these 11 trials were randomized, against placebo in three trials [20,25,26] and vs.

Table 2. Window-of-opportunity clinical trials investigating targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma

References	Drug(s)	Randomized	No. of patients	Duration of intervention (days)	Primary endpoint	Duration of accrual (months)	Grade 3/4 AEs	ORR	Predictive biomarkers	PD biomarkers	Surgery delays
Thomas <i>et al.</i> [19]	Erlotinib	No	35	20	Safety	25	19%	CT scan: 29%	p21 CDKN1A	↓pTyr ↓pERK1/2	No
Del Campo <i>et al.</i> [20]	Lapatinib vs. placebo	Yes	71 vs. 36	14–42	PD	16	>5%	CT scan/MRI: 6 vs. 0%	EGFR HER2	↓Ki67 ↓pEGFR ↓pEGFR	No ^a
Schmitz <i>et al.</i> [21]	Cetuximab vs. no treatment	No	33 vs. 5	21	Safety	30	9%	FDG-PET scan: 90 vs. 0%		↓Ki67 ↓pEGFR ↓ERK	No
Ferris <i>et al.</i> [22]	Cetuximab	No	40	21–28	PD	57	NR	CT scan: 33%		↑EGFR-specific T cells	NR
Gross <i>et al.</i> [25]	Erlotinib vs. erlotinib + sulindac vs. placebo	Yes	18 vs. 16 vs. 12	7–14	PD	36	6%	NR	pSrc	↓Ki67	NR
Bauman <i>et al.</i> [26]	Erlotinib vs. dasatinib vs. erlotinib + dasatinib vs. placebo	Yes	14 vs. 15 vs. 14 vs. 15	7–21	PD	44	≥7 vs. 8% vs. ≥7 vs. ≥13%	CT scan: 0 vs. 0 vs. 7 vs. 0%	pMAPK pSTAT3	↓pEGFR ↓Src	No
Machiels <i>et al.</i> [24]	Afatinib vs. no treatment	Yes	25 vs. 5	14	Efficacy	32	13%	FDG-PET scan: 70 vs. 0%	Cluster3- hypoxia score TP53		13%
Le Tourneau <i>et al.</i> [23]	Afatinib vs. no treatment	Yes	41 vs. 20	14–28	Predictive biomarkers	44	12%	CT scan/MRI: 7% FDG-PET scan: 59 vs. 0%	pHER4 pERK1/2 pRB	↑Tumor-infiltrating B cells NF-kappa B signaling	No
Uppaluri <i>et al.</i> [27]	Trametinib	No	20	7–16	PD	28	25%	Clinical assessment: 55% FDG-PET scan: 46%		↓pERK ↓CD44	5% ^b
Day <i>et al.</i> [28]	Rapamycin	No	16	21	PD	58	6%	CT scan: 25%		↓pS6 ↓pAKT ↓p4EBP ↑ERK ↓Ki67	No ^c
Curry <i>et al.</i> [29]	Metformin	No	50	14	PD	30	0%	NR		↑CAV1 ↑GALB ↑Apoptosis	No

AEs, adverse events; CT, computed tomography; ORR, overall response rate; PD, pharmacodynamic; NR, not reported.

^aPatients planned for definitive chemoradiation.

^bOne patient's treatment plan changed to a nonsurgical approach because of slow recovery after a grade 4 toxicity

^cPatients planned for definitive surgery or chemoradiation.

no treatment in two trials [23,24]. In another trial, there was a no treatment arm, without any randomization [21]. Drugs were given for one to four weeks prior to definitive treatment with surgery or chemoradiation, and up to six weeks in one study for which the definitive treatment was chemoradiation [20]. Primary endpoints were most often pharmacodynamics ($n = 7/11$; 64%), safety ($n = 2/11$; 18%), efficacy ($n = 1/11$; 9%) and predictive biomarkers ($n = 1/11$; 9%). The accrual in these trials was slow, with a median time of 32 months (range, 16–58 months).

Up to 25% of patients in these trials experienced grade 3 or 4 adverse events. No deaths related to the study drugs were reported in none of the trials. Although these adverse events were manageable, they frequently led to drug interruption, which might impact the results of the biological analyses because of the lack of sufficient drug exposure. On the opposite, some patients clinically responded to treatment, despite the short treatment duration.

The planned definitive surgery was found to be delayed in two trials [24,27]. In one trial, four patients ($n = 4/30$; 13%) had delayed surgery by up to 24 days due to grade 2–3 adverse events and organizational issues [24], whereas in another trial one patient ($n = 1/20$; 5%) did not undergo surgery due to a grade 4 adverse event [27]. Assessment of response to treatment included a morphological, pathological and fluorodeoxyglucose (FDG) uptake on FDG-PET scan. Response taken as a continuous variable might be useful to assess the predictive or the pharmacodynamic value of potential biomarkers, since no surrogate biological characteristics of efficacy have been validated so far.

It is striking to see that statistically significant predictive and/or pharmacodynamic biomarkers were identified in all trials in which these analyses were performed. All these potential biomarkers still need to be further validated in the clinical settings in which the drugs are (intended to be) approved (i.e., in the recurrent and/or metastatic setting most of the time). To our knowledge, this has not been done for any of the identified biomarkers. The results obtained in a treatment-naïve setting might not necessarily translate into the recurrent and/or metastatic patient population that is more resistant to drugs given prior treatments.

WINDOW-OF-OPPORTUNITY CLINICAL TRIALS INVESTIGATING IMMUNOTHERAPIES IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

We identified 11 trials evaluating immunotherapies alone or in combination in HNSCC (Table 3). Six out of these 11 trials were in fact neoadjuvant

immunotherapy trials [42,43[■],44[■],45,46,47[■]], with a primary objective of reduction in tumor size and subsequent tumor down-staging prior to surgery. We decided to include them in the window-of-opportunity clinical trials because these trials had secondary biological endpoints, and because the definitive treatment had not to be delayed. In addition, immunotherapies were given for a short period of time.

Several immunotherapies were investigated, including anti-PD-(L)1 agents either as single-agent [42,43[■],45] or in combination with anti-CTLA-4 agent [46,47[■],48] or metabolic modulator [49], small molecule TLR8 agonist [50,51], agonistic anti-OX40 mAb [52[■]], and immunomodulatory cytokines [53]. Most of these immunotherapies were either approved in recurrent and/or metastatic HNSCC (i.e., the PD-1 inhibitors nivolumab and pembrolizumab) [7,9], or had shown antitumor activity in heavily pretreated recurrent and/or metastatic HNSCC patients (i.e., the PD-L1 inhibitor durvalumab) [54]. In the contrary, concurrent blockade of both PD-L1 and CTLA-4 immune checkpoints with durvalumab and tremelimumab failed to achieve any beneficial survival outcome in the recurrent and/or metastatic setting [55,56].

Patients received a median number of two doses (range, 1–10) of immunotherapy. Overall, these studies reported no delays in the scheduled date of definitive surgery, and a favorable safety profile.

Predictive biomarkers of efficacy of immunotherapy were identified in these trials, including PD-L1 expression, tumor immune infiltration, tumor mutational burden, and mutations detected in the circulating tumor DNA. An association between PD-L1 expression and response to immunotherapy was reported in patients treated with one dose of pembrolizumab prior to surgery [42,44[■]], as previously demonstrated in the recurrent and/or metastatic setting [8,9]. This association, however, was not found in two other trials [46,48] suggesting that PD-L1 expression alone is not reliable enough to predict to the efficacy of immunotherapy.

CONCLUSION

Window-of-opportunity clinical trials in HNSCC are challenging to conduct. A close collaboration between medical oncologists and surgeons is a prerequisite for successful and rapid patients' accrual. Most of these trials reported no delays in the planned definitive treatment and provided clinical benefit in some patients.

These trials successfully explored the safety, short-term efficacy, pharmacodynamics, and predictive biomarkers of efficacy of novel targeted

Table 3. Window-of-opportunity clinical trials investigating immunotherapies in head and neck squamous cell carcinoma

References	Drug(s)	Randomized	No. of patients	No. of injection(s)	Primary endpoint(s)	Duration of accrual (months)	Grade 3/4 AEs ^a	ORR	Predictive biomarkers	PD biomarkers
Uppaluri <i>et al.</i> [42]	Pembrolizumab	No	36	1	Efficacy	27	0%	Complete/partial pTR: 44%	Tumor PD-L1 Immune infiltrate IFN γ activity	\uparrow Inflammatory gene signature \uparrow T-cell checkpoint Tumor clonal loss
Ferris <i>et al.</i> [43]	Nivolumab	No	52	2	Safety and efficacy	25	15%	CT scan/MRI: 8–12% Major/partial pTR: 6–24%	Inflammation gene signature CD8A B-cell and dendritic cell signatures PCD1 LAG3	
Duhen <i>et al.</i> [52]	Anti-OX40	No	17	3	Safety	28	0%	NR		\uparrow T cells CD4/CD8 (blood and tumor) \uparrow TILs CD103/CD39/CD8
Shayan <i>et al.</i> [51]	Cetuximab + metolimid	No	14	4	PD	22	0%	NR		\downarrow Treg \downarrow CTLA-4 \downarrow CD73 \downarrow Membrane-bound TGF β \uparrow EGFR-specific T cells
Wolf <i>et al.</i> [53]	IRX2-cytokines vs. no treatment	Yes	64 vs. 32	10	PD	24	NR	CT scan/MRI: 17%		\uparrow TILs CD8+ \uparrow PD-L1
Wise-Draper <i>et al.</i> [44]	Pembrolizumab	No	92	1	Efficacy	56	NR	Major/partial pTR: 39%	PD-L1 expression (GPS and TPS) IDO-1 PD-L1 PD-L2 IFN γ gene expression signature	\uparrow Gene-expression signatures for macrophages, MHC-2, and mast cells
Knochelmann <i>et al.</i> [45]	Nivolumab	No	14	4	Efficacy	36		CT scan/MRI: 33%	FLT4 CDKN2A YAP1 JAK2 TMB	\uparrow Systemic TCR repertoire diversification
Schoenfeld <i>et al.</i> [46]	Nivolumab vs. nivolumab + ipilimumab	Yes	14 vs. 15	1	Safety and efficacy	48	13 vs. 33%	CT scan/MRI: 13 vs. 38% pTR \geq 10%: 38 vs. 40% Complete pTR: 8 vs. 20%		T cells CD4+

Table 3 (Continued)

References	Drug(s)	Randomized	No. of patients	No. of injection(s)	Primary endpoint(s)	Duration of accrual (months)	Grade 3/4 AEs ^a	ORR	Predictive biomarkers	PD biomarkers
Curry <i>et al.</i> [49]	Durvalumab + meiforin vs. durvalumab	Yes	8 vs. 26	1	PD	39	NR	NR	CD8+ and FoxP3 intercellular distances	↑FoxP3 and CTLA-4
Ferraro <i>et al.</i> [48]	Durvalumab vs. durvalumab + tremelimumab	Yes	14 vs. 14	2	PD	18	20 vs. 7%	CT scan/MRI: 43% in both arms	Not found	↑TILs CD8+
Vos <i>et al.</i> [47 ^b]	Nivolumab vs. nivolumab + ipilimumab	No	6 vs. 20	2	Safety and efficacy	32	33 vs. 38%	Major pTR: 17 vs. 35%	AID/APOBEC-associated mutational profile	↓Hypoxia RNA signature

AEs, adverse events; EGFR, epidermal growth factor receptor; NR, not reported; ORR, overall response rate; PD, pharmacodynamic; pTR, pathological tumor response. ^aThe studies reported no delays in the scheduled date of definitive surgery.

therapies and immunotherapies. All these potential biomarkers still need to be validated in recurrent and/or metastatic HNSCC in which the drugs will *a priori* be further developed.

Acknowledgements

None.

Financial support and sponsorship

None.

Conflicts of interest

C.L.T: Roche, Seattle Genetics, Rakuten, Nanobiotix, MSD, BMS, Merck Serono, AstraZeneca, GlaxoSmithKline, Novartis, Celgene, ALX Oncology. E.B received honoraria and nonfinancial support from Eisai, Merck & Co., Kenilworth, NJ, Sandoz, and Daiichi Sankyo, and participated in advisory boards from Egle Tx. G.M: None.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68:394–424.
2. Machiels J-P, René Leemans C, Golusinski W, *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2020; 31:1462–1475.
3. Leeman JE, Li J-G, Pei X, *et al.* Patterns of treatment failure and postrecurrence outcomes among patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma after chemoradiotherapy using modern radiation techniques. *JAMA Oncol* 2017; 3:1487–1494.
4. Chow LQM. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2020; 382:60–72.
5. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 354:567–578.
6. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, *et al.* Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008; 359:1116–1127.
7. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, *et al.* Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2016; 375:1856–1867.
8. Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, *et al.* Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019; 393:156–167.
9. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, *et al.* Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019; 394:1915–1928.
10. Kalinsky K, Hershman DL. Cracking open window of opportunity trials. *J Clin Oncol* 2012; 30:2573–2575.
11. Schmitz S, Caballero C, Locati LD. Perspectives on window of opportunity trials in head and neck cancer: lessons from the EORTC 90111-24111-NOCI-HNCG study. *Eur J Cancer* 2018; 104:219–223.
12. Borcoman E, Kanjanapan Y, Champiat S, *et al.* Novel patterns of response under immunotherapy. *Ann Oncol* 2019; 30:385–396.
13. Baxi SS, Dunn LA, Burtneß BA. Amidst the excitement: a cautionary tale of immunotherapy, pseudoprogression and head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2016; 62:147–148.
14. Hanna GJ, Adkins DR, Zolkind P, *et al.* Rationale for neoadjuvant immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2017; 73:65–69.
15. Saâda-Bouزيد E, Defaucheux C, Karabajakian A, *et al.* Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2017; 28:1605–1611.
16. Marret G, Bièche I, Dupain C, *et al.* Genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma: level of evidence according to ESMO scale for clinical actionability of molecular targets (ESCAT). *JCO Precis Oncol* 2021; 5:215–226.

17. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, *et al.* Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:824–832.
 18. Chung CH, Ely K, McGavran L, *et al.* Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* 2006; 24:4170–4176.
 19. Thomas F, Rochaix P, Benlyazid A, *et al.* Pilot study of neoadjuvant treatment with erlotinib in nonmetastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13:7086–7092.
 20. Del Campo JM, Hitt R, Sebastian P, *et al.* Effects of lapatinib monotherapy: results of a randomised phase II study in therapy-naïve patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 2011; 105:618–627.
 21. Schmitz S, Hamoir M, Reychler H, *et al.* Tumour response and safety of cetuximab in a window preoperative study in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* 2013; 24:2261–2266.
 22. Ferris RL, Kim S, Trivedi S, *et al.* Correlation of antitumor adaptive immunity with clinical response in a phase II ‘Window’ trial of neoadjuvant cetuximab in patients with resectable stage III-IV head and neck squamous carcinoma (HNSCC). *J Clin Oncol* 2016; 34:6060–16060.
 23. Le Tourneau C, Delord J-P, Dolivet G, *et al.* PREDICTOR (UNICANCER GEP11): randomized phase II study of preoperative afatinib in untreated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients. *J Clin Oncol* 2017; 35:6021–16021.
 24. Machiels J-P, Bossi P, Menis J, *et al.* Activity and safety of afatinib in a window preoperative EORTC study in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Ann Oncol* 2018; 29:985–991.
 25. Gross ND, Bauman JE, Gooding WE, *et al.* Erlotinib, erlotinib-sulindac versus placebo: a randomized, double-blind, placebo-controlled window trial in operable head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20:3289–3298.
 26. Bauman JE, Duvvuri U, Gooding WE, *et al.* Randomized, placebo-controlled window trial of EGFR, Src, or combined blockade in head and neck cancer. *JCI Insight* 2017; 2:e90449.
 27. Uppaluri R, Winkler AE, Lin T, *et al.* Biomarker and tumor responses of oral cavity squamous cell carcinoma to trametinib: a phase II neoadjuvant window-of-opportunity clinical trial. *Clin Cancer Res* 2017; 23:2186–2194.
 28. Day TA, Shirai K, O’Brien PE, *et al.* Inhibition of mTOR signaling and clinical activity of rapamycin in head and neck cancer in a window of opportunity trial. *Clin Cancer Res* 2019; 25:1156–1164.
 29. Curry J, Johnson J, Tassone P, *et al.* Metformin effects on head and neck squamous carcinoma microenvironment: window of opportunity trial. *Laryngoscope* 2017; 127:1808–1815.
 30. Burtneess B, Goldwasser MA, Flood W, *et al.* Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2005; 23:8646–8654.
 31. Vermorken JB, Trigo J, Hitt R, *et al.* Open-label, uncontrolled, multicenter phase II study to evaluate the efficacy and toxicity of cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy. *J Clin Oncol* 2007; 25:2171–2177.
 32. Machiels J-PH, Haddad RI, Fayette J, *et al.* Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16:583–594.
 33. Seiwert TY, Fayette J, Cupissol D, *et al.* A randomized, phase II study of afatinib versus cetuximab in metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* 2014; 25:1813–1820.
 34. Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, *et al.* Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol* 2004; 22:77–85.
 35. de Souza JA, Davis DW, Zhang Y, *et al.* A phase II study of lapatinib in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2012; 18:2336–2343.
 36. Chen Z, Zhang X, Li M, *et al.* Simultaneously targeting epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and cyclooxygenase-2, an efficient approach to inhibition of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2004; 10:5930–5939.
 37. Brooks HD, Glisson BS, Bekele BN, *et al.* Phase 2 study of dasatinib in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2011; 117:2112–2119.
 38. Judd NP, Winkler AE, Murillo-Sauca O, *et al.* ERK1/2 regulation of CD44 modulates oral cancer aggressiveness. *Cancer Res* 2012; 72:365–374.
 39. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 2015; 517:576–582.
 40. Iglesias-Bartolome R, Martin D, Gutkind JS. Exploiting the head and neck cancer oncogenome: widespread PI3K-mTOR pathway alterations and novel molecular targets. *Cancer Discov* 2013; 3:722–725.
 41. Molinolo AA, Marsh C, El Dinali M, *et al.* mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. *Clin Cancer Res* 2012; 18:2558–2568.
 42. Uppaluri R, Campbell KM, Egloff AM, *et al.* Neoadjuvant and adjuvant pembrolizumab in resectable locally advanced, human papillomavirus-unrelated head and neck cancer: a multicenter, phase II trial. *Clin Cancer Res* 2020; 26:5140–5152.
 43. Ferris RL, Spanos WC, Leidner R, *et al.* Neoadjuvant nivolumab for patients with resectable HPV-positive and HPV-negative squamous cell carcinomas of the head and neck in the CheckMate 358 trial. *J Immunother Cancer* 2021; 9:e002568.
- In CheckMate 358, short course of nivolumab produced low rates of radiographic and pathological responses, suggesting that the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) may be immunosuppressive. HPV-positive tumors displayed a more inflammatory microenvironment with enhanced expression of immune checkpoints in comparison with HPV-negative tumors.
44. Wise-Draper TM, Gulati S, Palackdharry S, *et al.* Phase II clinical trial of neoadjuvant and adjuvant pembrolizumab in resectable local-regionally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2022; 28:1345–1352.
- In this study, the extent of pathological response to neoadjuvant pembrolizumab correlated positively with survival outcomes. PD-L1 expression predicted sensitivity to pembrolizumab in preoperative HNSCC patients.
45. Knochelmann HM, Horton JD, Liu S, *et al.* Neoadjuvant presurgical PD-1 inhibition in oral cavity squamous cell carcinoma. *Cell Rep Med* 2021; 2:100426.
 46. Schoenfeld JD, Hanna GJ, Jo VY, *et al.* Neoadjuvant nivolumab or nivolumab plus ipilimumab in untreated oral cavity squamous cell carcinoma: a phase 2 open-label randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2020; 6:1563–1570.
 47. Vos JL, Elbers JBW, Krijgsman O, *et al.* Neoadjuvant immunotherapy with nivolumab and ipilimumab induces major pathological responses in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Commun* 2021; 12:7348.
- In IMCISION, combination immune checkpoint blockade did not delay standard of care therapy. The extent of pathological response correlated positively with recurrence-free survival.
48. Ferrarotto R, Bell D, Rubin ML, *et al.* Impact of neoadjuvant durvalumab with or without tremelimumab on CD8+ tumor lymphocyte density, safety, and efficacy in patients with oropharynx cancer: CIAO trial results. *Clin Cancer Res* 2020; 26:3211–3219.
 49. Curry J, Alhemri A, Philips R, *et al.* CD8+ and FoxP3+ T-cell cellular density and spatial distribution after programmed death-ligand 1 check point inhibition. *Laryngoscope* 2022; 10:30389.
 50. Chow LQM, Morishima C, Eaton KD, *et al.* Phase Ib trial of the toll-like receptor 8 agonist, motolimod (VTX-2337), combined with cetuximab in patients with recurrent or metastatic SCCHN. *Clin Cancer Res* 2017; 23:2442–2450.
 51. Shayan G, Kansy BA, Gibson SP, *et al.* Phase Ib study of immune biomarker modulation with neoadjuvant cetuximab and TLR8 stimulation in head and neck cancer to overcome suppressive myeloid signals. *Clin Cancer Res* 2018; 24:62–72.
 52. Duhon R, Ballesteros-Merino C, Frye AK, *et al.* Neoadjuvant anti-OX40 (MEDI6469) therapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma activates and expands antigen-specific tumor-infiltrating T cells. *Nat Commun* 2021; 12:1047.
- The study is the first report of a human T-cell agonist antibody specific for OX40 tested in the preoperative setting. Delivering anti-OX40 treatment prior to surgery was safe, and may have conferred a clinical benefit in a subset of patients with increased tumor-reactive tumor-infiltrating lymphocytes.
53. Wolf GT, Liu S, Bellile E, *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes after neoadjuvant IRX-2 immunotherapy in oral squamous cell carcinoma: interim findings from the INSPIRE trial. *Oral Oncol* 2020; 111:104928.
 54. Segal NH, Ou S-HI, Balmanoukian A, *et al.* Safety and efficacy of durvalumab in patients with head and neck squamous cell carcinoma: results from a phase I/II expansion cohort. *Eur J Cancer* 2019; 109:154–161.
 55. Ferris RL, Haddad R, Even C, *et al.* Durvalumab with or without tremelimumab in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: EAGLE, a randomized, open-label phase III study. *Ann Oncol* 2020; 31:942–950.
 56. Siu LL, Even C, Mesia R, *et al.* Safety and efficacy of durvalumab with or without tremelimumab in patients with PD-L1-low/negative recurrent or metastatic HNSCC: the phase 2 CONDOR randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2019; 5:195–203.

4.1.3 AACR 2023, Abstract #3363 *Spatial and longitudinal tumor heterogeneity in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with primary surgery*

Spatial and longitudinal tumor heterogeneity in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with primary surgery

Grégoire Marret¹, Constance Lamy¹, Sophie Vacher², Mathieu Séné², Ladjidi Ahmanache², Laura Courtois³, Zakhia El Bejaoui³, Jerzy Kijanienko³, Charlotte Martinat³, Nicolas Servant⁴, Choumouss Kamoum⁴, Linda Larbi Cherif⁵, Thierry Bronzini⁵, Cédric Balsa⁶, Jean-François Laes⁶, Aubray Prévot⁶, Sébastien Sauvage⁶, Maxime Lienard⁶, Emmanuel Martin⁶, Bérengère Genin⁶, Nathalie Badois⁷, Maria Lesnik⁷, Antoine Dubray-Vautrin⁷, Olivier Choussy⁷, Wahib Ghanem⁸, Rabah Taouachi⁸, Julien Mastiah Planchon⁸, Ivan Blechez⁸, Maud Kamali¹, Christophe Le Tourneau^{1,9}

¹ Department of Drug Development and Innovation (D3), Institut Curie, Paris-Saclay University, Paris, France; ² Pharmacogenomics Unit, Genetics Department, Institut Curie, Paris, France; ³ Department of Pathology, Institut Curie, Paris, France; ⁴ Bioinformatics and Computational Systems Biology of Cancer, PSL Research University, Mimes Paris Tech, INSERM U900, Paris, France; ⁵ Department of Pathology, Institut Curie, Paris, France; ⁶ Department of Oncologic Surgery, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France; ⁷ Department of Oncologic Surgery, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France; ⁸ Department of Oncologic Surgery, Institut Curie, PSL Research University, Saint-Cloud, France; ⁹ INSERM U900 Research Unit, Institut Curie, Saint-Cloud, France

AACR 2023 Abstract #33363

BACKGROUND

In contrast to breast cancers and non-small cell lung cancers, the potential of cell-free tumor DNA (ctDNA) analysis for early detection of recurrence, response monitoring and therapeutics has not been sufficiently studied in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

OBJECTIVES

We aimed (1) to compare variants identified in ctDNA versus surgical tumor specimen, (2) to study dynamics of the ctDNA mutational landscape, and (3) to study the relationship between ctDNA detection and recurrence in HNSCC patients.

PATIENTS AND METHODS

Forty-one HNSCC patients treated with curative-intent primary surgery from SCANDARE (NCT03017573) were included. A custom NGS panel of 571 genes (DRAGON) was used on tumors DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissues at surgery to identify

	n (%)
Total	41 (100%)
Age, years	65 (46-91)
Sex, n (%)	33 (80%) 8 (20%)
Tumor location, n (%)	20 (49%) 3 (7%) 16 (39%) 2 (5%)
Panel including up to 15 genes (OncoFOLLOW) based in somatic alterations detected on the tissue.	36 (88%) 5 (12%)
Variant allele frequency (VAF) was calculated as the proportion of ctDNA harboring the variant in the background of wild-type ctDNA.	23 (56%) 18 (44%)
Grading, n (%)	19 (46%) 22 (54%)
T classification, n (%)	13 (32%) 16 (39%) 12 (29%)
Lymph node involvement, n (%)	10 (24%) 31 (76%)
Overall survival status, n (%)	27 (66%) 14 (34%)
Tumor tissues available, n (%)	41 (100%)
ctDNA samples available, n (%)	41 (100%)
Surgery	37 (90%)
Within 19 weeks from surgery	20 (49%)
Six months	22 (73%)
Recurrence ¹	

¹Percentage based on the subset of patients with recurrent disease

RESULTS

Figure 1. Tissue- and ctDNA-based mutational landscape of 41 treatment-naïve HNSCC patients, and dynamics associated with recurrence in 22 patients.

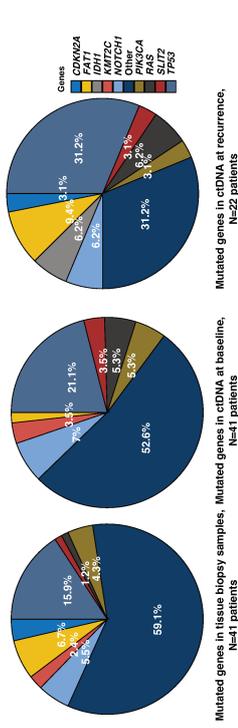


Figure 2. Overview of pathogenic variants in tumor tissue and paired ctDNA, and mutation-level comparison in 15 HNSCC patients for whom ctDNA was informative.

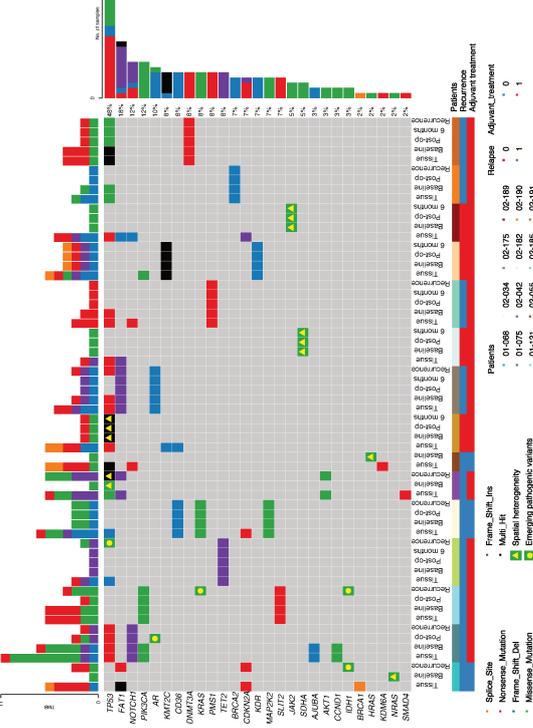


Figure 3. Serial monitoring of ctDNA by adjuvant treatment modalities (adjuvant [chemo]radiotherapy, n=28 patients; no adjuvant treatment, n=13 patients) and association with clinical events (death, n=13 patients, recurrence, n=31 patients).

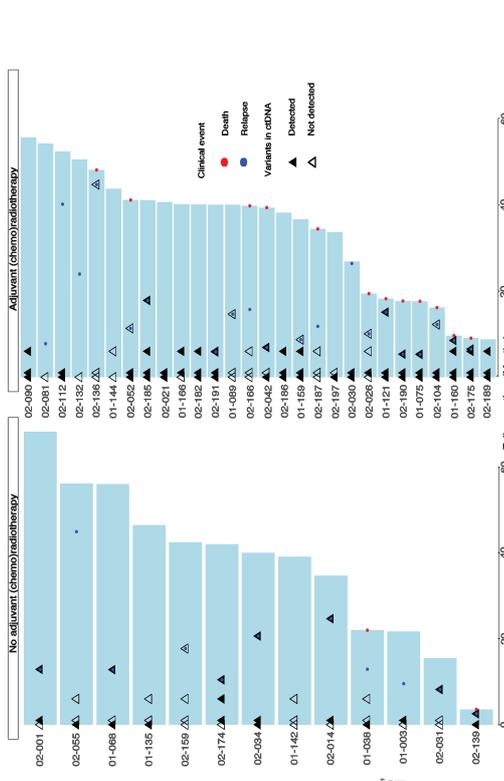
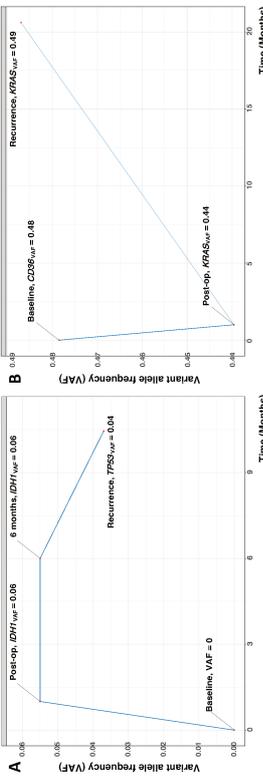


Figure 4. Longitudinal monitoring of dominant clone allele frequency on ctDNA in recurring patients 02-174 (A) and 02-034 (B). Mutations in IDH1 and KRAS were detected in post-operative ctDNA at 0.06 and 0.44 variant allele frequency respectively, suggesting minimal residual disease.



CONCLUSIONS

- A high concordance between tissue and ctDNA among the most frequently mutated genes has been observed.
- In some cases, ctDNA-based NGS detected pathogenic variants that were missing from paired tissue-based NGS results, suggesting spatial heterogeneity.
- Longitudinal monitoring of ctDNA suggested temporal heterogeneity through mutational HNSCC landscape dynamics, and identified acquired pathogenic variants over time.
- Longitudinal monitoring of ctDNA might have the potential for detecting minimal residual disease and molecular-level disease recurrence in HNSCC.

4.1.4 ESMO 2023, Abstract #2773 *Prognostic value of pathological intratumor heterogeneity in patients with head and neck squamous cell carcinoma treated with upfront surgery*

4.1.5 ESMO 2023, Abstract #2547 *Serial cell-free tumor DNA in prognosing survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma treated with upfront surgery*

Serial cell-free tumor DNA in prognosing survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma treated with upfront surgery

G. Marret^{1*}, C. Lamy¹, S. Vacher², L. Ahmanache², L. Courtois², M. Séné², J. Klijanienko³, C. Martinat³, M. Halladjian¹, T. Bronzini⁴, C. Baisat⁵, S. Sauvage⁵, E. Martin⁵, G. Rougier⁶, A. Dubray-Vautrin⁶, O. Choussy⁶, J. Masliah Planchon², N. Servant⁷, I. Blêche^{2,8}, C. Le Tourneau^{1,9}, M. Kamal¹

¹: Department of Drug Development and Innovation (D3), Institut Curie, Paris-Saclay University, Paris, France; ²: Pharmacogenomics Unit, Genetics Department, Institut Curie, Paris, France; ³: Department of Pathology, Institut Curie, Centre des Ressources Biologiques, Institut Curie Paris; ⁴: OncoDNA, Gosselies, Belgium; ⁵: Paris 6 Department of Oncologic Surgery, Institut Curie, PSL Research University, Institut Curie, PSL Research University, Mines Paris Tech, INSERM U900, Paris, France; ⁶: BINSERM U1016, Faculty of Pharmaceutical and Biological Sciences, Université de Paris Cité, Paris, France; ⁷: INSERM U900 Research Unit, Institut Curie, Saint-Cloud, France; *Presenting author declares no conflict of interest.

ESMO 2023; FPN 864P

BACKGROUND

- Detection of persistent circulating tumor DNA (ctDNA) after curative-intent surgery can identify patients with minimal residual disease (MRD) who will ultimately recur.
- The clinical validity of ctDNA-based MRD detection, as well as the prognostic impact of ctDNA detection has not yet been sufficiently studied in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

OBJECTIVES

We assessed whether postoperative ctDNA could be a biomarker for early detection of MRD, and the prognostic value of ctDNA in resected HNSCC.

PATIENTS AND METHODS

- Targeted next-generation sequencing was performed on resected tumor tissues and serial blood samples collected from 41 HNSCC patients treated with upfront curative-intent surgery in SCANDARE (NCT03017573).
- All 41 patients displayed trackable mutations on tumor tissues. Serial plasma samples collected from 41 patients at surgery, 34 patients within 14 weeks after surgery, 18 patients at six months, and 22 patients at recurrence were correlated with recurrence-free survival (RFS) and overall survival (OS).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

- ctDNA-based MRD detection anticipated clinical recurrence by 9.9 months in 63% of HNSCC patients.
- ctDNA-based MRD detection within 14 weeks after surgery correlated with disease recurrence in multivariate analysis.
- Early detection of ctDNA after curative-intent surgery might be of interest to stratify HNSCC patients for adjuvant therapy.

RESULTS

Table 1. Patient characteristics

	n (%)	Recurrent patients (n = 31)	Non-recurrent patients (n = 10)	Total (n = 41)
Age, years	Median (IQR)	66 (57-75)	65 (58-75)	
Sex, n (%)				
Male	25 (81%)	8 (80%)	33 (80%)	
Female	6 (19%)	2 (20%)	8 (20%)	
Smoker, n (%)				
Current/Former	15 (48%)	7 (70%)	22 (54%)	
Never	16 (52%)	3 (30%)	19 (46%)	
Alcohol consumption, n (%)				
Never	15 (48%)	5 (50%)	20 (49%)	
Current/Former	16 (52%)	5 (50%)	21 (51%)	
Tumor location, n (%)				
Oral cavity	12 (39%)	8 (80%)	20 (49%)	
Oropharynx	15 (48%)	1 (10%)	16 (39%)	
Larynx	3 (10%)	0	3 (7%)	
Hypopharynx	1 (3%)	1 (10%)	2 (5%)	
Grading, n (%)				
Well/Moderately differentiated	27 (87%)	9 (90%)	36 (88%)	
Poorly undifferentiated	4 (13%)	1 (10%)	5 (12%)	
HPV status, n (%)				
HPV positive	33 (78%)	7 (70%)	30 (73%)	
HPV negative	8 (20%)	3 (30%)	11 (27%)	
T classification, n (%)				
T3/T4	16 (52%)	7 (70%)	23 (56%)	
T3/T4	15 (48%)	3 (30%)	18 (44%)	
Lymph node involvement, n (%)				
Negative	13 (42%)	6 (60%)	19 (46%)	
Positive	18 (58%)	4 (40%)	22 (54%)	
Adjuvant therapy, n (%)				
None	11 (35%)	2 (20%)	13 (32%)	
Radiotherapy alone	13 (42%)	3 (30%)	16 (39%)	
Chemotherapy	7 (23%)	5 (50%)	12 (29%)	

Abbreviations: IQR: interquartile range; HPV: human papillomavirus

Figure 1. Interval-censored follow-up time plots annotated for longitudinal ctDNA profiling and clinical events in 41 patients

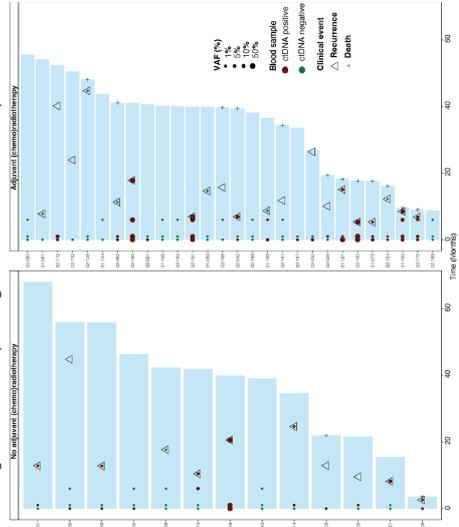


Figure 2. Kaplan-Meier survival curves showing RFS stratified by ctDNA detection status at surgery (A), within 14 weeks after surgery (B), and at six months (C)

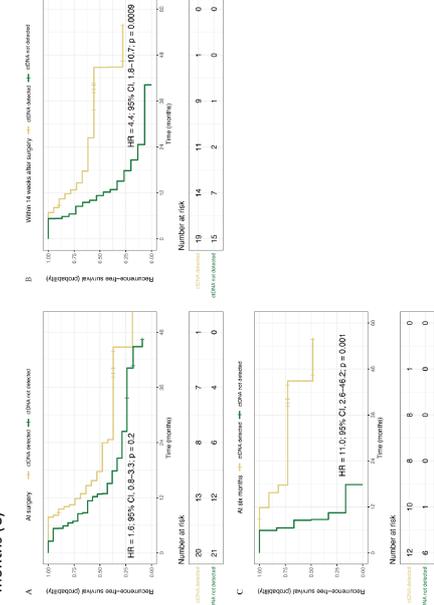


Figure 3. Kaplan-Meier survival curves showing OS stratified by ctDNA detection status at surgery (A), within 14 weeks after surgery (B), at six months (C), and at recurrence (D)

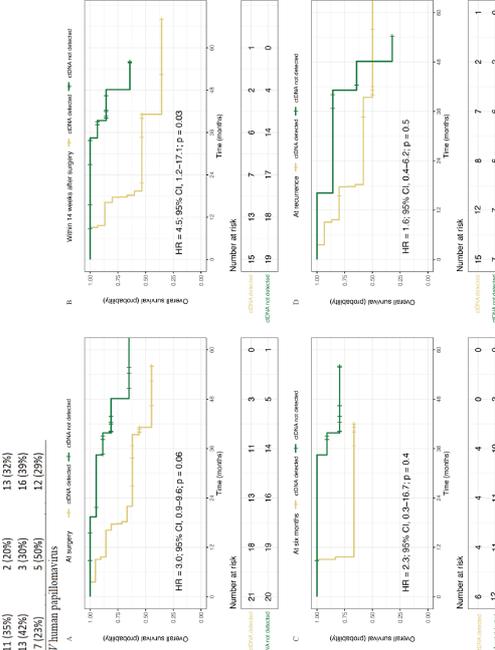
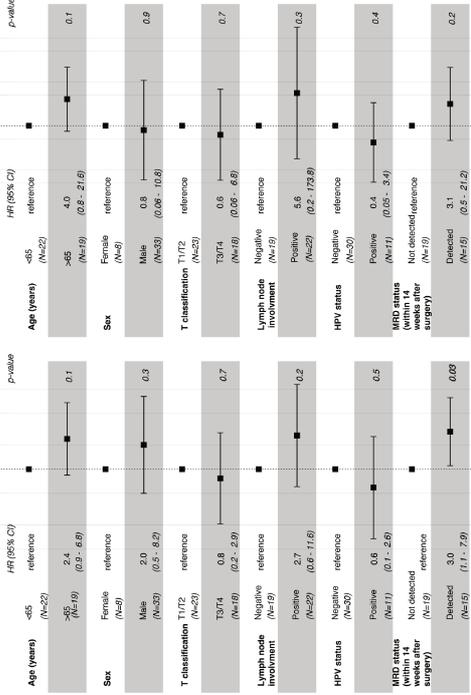


Figure 4. Multivariable prognostic models of RFS (A) and OS (B)



CONTACT
Grégoire Marret
Maud Kamal
Maud.kamal@curie.fr

OncoDNA
THE GENOMIC TECHNOLOGICAL COMPANY

institut Curie

4.2 Bibliographie

1. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23–28 (1976).
2. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
3. Lipinski, K. A. *et al.* Cancer Evolution and the Limits of Predictability in Precision Cancer Medicine. *Trends Cancer* **2**, 49–63 (2016).
4. Vermeulen, L. *et al.* Defining stem cell dynamics in models of intestinal tumor initiation. *Science* **342**, 995–998 (2013).
5. Marusyk, A., Almendro, V. & Polyak, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* **12**, 323–334 (2012).
6. McGranahan, N. & Swanton, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* **168**, 613–628 (2017).
7. Gerlinger, M. *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**, 883–892 (2012).
8. Alizadeh, A. A. *et al.* Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med* **21**, 846–853 (2015).
9. Solary, E. [A reductionnist approach of cancer]. *Med Sci (Paris)* **30**, 683–687 (2014).
10. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–724 (2009).
11. Garraway, L. A. & Lander, E. S. Lessons from the cancer genome. *Cell* **153**, 17–37 (2013).
12. Campbell, P. J. *et al.* Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13081–13086 (2008).
13. Merlo, L. M. F., Pepper, J. W., Reid, B. J. & Maley, C. C. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* **6**, 924–935 (2006).
14. Greaves, M. & Maley, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306–313 (2012).
15. Morange, M. [Hypotheses for the genesis of cancer: a historical perspective]. *Med Sci (Paris)* **30**, 679–682 (2014).
16. Venkatesan, S. & Swanton, C. Tumor Evolutionary Principles: How Intratumor Heterogeneity Influences Cancer Treatment and Outcome. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **35**, e141-149 (2016).
17. Greaves, M. Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discov* **5**, 806–820 (2015).

18. Klco, J. M. *et al.* Functional heterogeneity of genetically defined subclones in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **25**, 379–392 (2014).
19. Garg, M. *et al.* Profiling of somatic mutations in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD at diagnosis and relapse. *Blood* **126**, 2491–2501 (2015).
20. Landau, D. A. *et al.* Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* **526**, 525–530 (2015).
21. Fisher, R. *et al.* Development of synchronous VHL syndrome tumors reveals contingencies and constraints to tumor evolution. *Genome Biol* **15**, 433 (2014).
22. Williams, M. J., Sottoriva, A. & Graham, T. A. Measuring Clonal Evolution in Cancer with Genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **20**, 309–329 (2019).
23. Juric, D. *et al.* Convergent loss of PTEN leads to clinical resistance to a PI(3)K α inhibitor. *Nature* **518**, 240–244 (2015).
24. Gerlinger, M. *et al.* Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat Genet* **46**, 225–233 (2014).
25. Marusyk, A. *et al.* Non-cell-autonomous driving of tumour growth supports sub-clonal heterogeneity. *Nature* **514**, 54–58 (2014).
26. Cleary, A. S., Leonard, T. L., Gestl, S. A. & Gunther, E. J. Tumour cell heterogeneity maintained by cooperating subclones in Wnt-driven mammary cancers. *Nature* **508**, 113–117 (2014).
27. Kim, M.-Y. *et al.* Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* **139**, 1315–1326 (2009).
28. Gatenby, R. A., Silva, A. S., Gillies, R. J. & Frieden, B. R. Adaptive therapy. *Cancer Res* **69**, 4894–4903 (2009).
29. Landau, D. A. *et al.* Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* **152**, 714–726 (2013).
30. Sottoriva, A. *et al.* A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet* **47**, 209–216 (2015).
31. Williams, M. J., Werner, B., Barnes, C. P., Graham, T. A. & Sottoriva, A. Identification of neutral tumor evolution across cancer types. *Nat. Genet.* **48**, 238–244 (2016).
32. Baca, S. C. *et al.* Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* **153**, 666–677 (2013).
33. Cross, W. C., Graham, T. A. & Wright, N. A. New paradigms in clonal evolution: punctuated equilibrium in cancer. *J Pathol* **240**, 126–136 (2016).
34. Bielski, C. M. *et al.* Genome doubling shapes the evolution and prognosis of advanced

- cancers. *Nat Genet* **50**, 1189–1195 (2018).
35. Nik-Zainal, S. *et al.* Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* **149**, 979–993 (2012).
 36. Korb, J. O. & Campbell, P. J. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell* **152**, 1226–1236 (2013).
 37. Shen, M. M. Chromoplexy: a new category of complex rearrangements in the cancer genome. *Cancer Cell* **23**, 567–569 (2013).
 38. Gao, R. *et al.* Punctuated copy number evolution and clonal stasis in triple-negative breast cancer. *Nat Genet* **48**, 1119–1130 (2016).
 39. Jamal-Hanjani, M. *et al.* Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **376**, 2109–2121 (2017).
 40. Barthel, F. P. *et al.* Longitudinal molecular trajectories of diffuse glioma in adults. *Nature* **576**, 112–120 (2019).
 41. Turajlic, S. *et al.* Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell* **173**, 595–610.e11 (2018).
 42. Dewhurst, S. M. *et al.* Tolerance of whole-genome doubling propagates chromosomal instability and accelerates cancer genome evolution. *Cancer Discov* **4**, 175–185 (2014).
 43. López, S. *et al.* Interplay between whole-genome doubling and the accumulation of deleterious alterations in cancer evolution. *Nat Genet* **52**, 283–293 (2020).
 44. Maley, C. C. *et al.* Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nat Rev Cancer* **17**, 605–619 (2017).
 45. Tomlinson, I. P., Novelli, M. R. & Bodmer, W. F. The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14800–14803 (1996).
 46. 1000 Genomes Project Consortium *et al.* A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* **467**, 1061–1073 (2010).
 47. Aguilera, A. & Gómez-González, B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9**, 204–217 (2008).
 48. Aguilera, A. & García-Muse, T. Causes of genome instability. *Annu Rev Genet* **47**, 1–32 (2013).
 49. Geigl, J. B., Obenauf, A. C., Schwarzbraun, T. & Speicher, M. R. Defining ‘chromosomal instability’. *Trends Genet* **24**, 64–69 (2008).
 50. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 220–228 (2010).
 51. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**,

646–674 (2011).

52. Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J. & Swanton, C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* **501**, 338–345 (2013).
53. Alexandrov, L. B. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421 (2013).
54. Lawrence, M. S. *et al.* Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* **505**, 495–501 (2014).
55. Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333–339 (2013).
56. Yang, L. *et al.* Diverse mechanisms of somatic structural variations in human cancer genomes. *Cell* **153**, 919–929 (2013).
57. Zack, T. I. *et al.* Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat Genet* **45**, 1134–1140 (2013).
58. Feuk, L., Carson, A. R. & Scherer, S. W. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* **7**, 85–97 (2006).
59. Alkan, C., Coe, B. P. & Eichler, E. E. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet* **12**, 363–376 (2011).
60. Sudmant, P. H. *et al.* An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature* **526**, 75–81 (2015).
61. Redon, R. *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**, 444–454 (2006).
62. Beroukhi, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899–905 (2010).
63. Burrell, R. A. *et al.* Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* **494**, 492–496 (2013).
64. Bakhoun, S. F. *et al.* The mitotic origin of chromosomal instability. *Curr Biol* **24**, R148–149 (2014).
65. Leibowitz, M. L., Zhang, C.-Z. & Pellman, D. Chromothripsis: A New Mechanism for Rapid Karyotype Evolution. *Annu Rev Genet* **49**, 183–211 (2015).
66. Heng, H. H. *et al.* Chromosomal instability (CIN): what it is and why it is crucial to cancer evolution. *Cancer Metastasis Rev* **32**, 325–340 (2013).
67. Heng, H. H. Q., Regan, S. M., Liu, G. & Ye, C. J. Why it is crucial to analyze non clonal chromosome aberrations or NCCAs? *Mol Cytogenet* **9**, 15 (2016).
68. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*

348, 69–74 (2015).

69. Korolev, K. S. *et al.* Selective sweeps in growing microbial colonies. *Phys Biol* **9**, 026008 (2012).
70. Fidler, I. J. & Kripke, M. L. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* **197**, 893–895 (1977).
71. Solá, M. *et al.* Prognostic value of hematogenous dissemination and biological profile of the tumor in early breast cancer patients: a prospective observational study. *BMC Cancer* **11**, 252 (2011).
72. Damsky, W. E., Theodosakis, N. & Bosenberg, M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene* **33**, 2413–2422 (2014).
73. De Craene, B. & Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* **13**, 97–110 (2013).
74. Wushou, A. *et al.* Correlation of increased twist with lymph node metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* **70**, 1473–1479 (2012).
75. Hüsemann, Y. *et al.* Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* **13**, 58–68 (2008).
76. Klein, C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* **9**, 302–312 (2009).
77. Hubert, S. & Abastado, J.-P. [The early steps of the metastatic process]. *Med Sci (Paris)* **30**, 378–384 (2014).
78. Messer, P. W. & Petrov, D. A. Population genomics of rapid adaptation by soft selective sweeps. *Trends Ecol Evol* **28**, 659–669 (2013).
79. Pennings, P. S. & Hermisson, J. Soft sweeps II--molecular population genetics of adaptation from recurrent mutation or migration. *Mol Biol Evol* **23**, 1076–1084 (2006).
80. Diaz, L. A. *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* **486**, 537–540 (2012).
81. Misale, S. *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* **486**, 532–536 (2012).
82. Martincorena, I. *et al.* Somatic mutant clones colonize the human esophagus with age. *Science* **362**, 911–917 (2018).
83. Teixeira, V. H. *et al.* Deciphering the genomic, epigenomic, and transcriptomic landscapes of pre-invasive lung cancer lesions. *Nat Med* **25**, 517–525 (2019).
84. Laconi, E., Marongiu, F. & DeGregori, J. Cancer as a disease of old age: changing mutational and microenvironmental landscapes. *Br J Cancer* **122**, 943–952 (2020).

85. Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S. & Jemal, A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* **73**, 17–48 (2023).
86. DeGregori, J., Pharoah, P., Sasieni, P. & Swanton, C. Cancer Screening, Surrogates of Survival, and the Soma. *Cancer Cell* **38**, 433–437 (2020).
87. Riva, L. *et al.* The mutational signature profile of known and suspected human carcinogens in mice. *Nat Genet* **52**, 1189–1197 (2020).
88. Nguyen, D. X., Bos, P. D. & Massagué, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* **9**, 274–284 (2009).
89. Meacham, C. E. & Morrison, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**, 328–337 (2013).
90. Clappier, E. *et al.* Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J Exp Med* **208**, 653–661 (2011).
91. Gutmann, D. H. *et al.* Neurofibromatosis type 1. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17004 (2017).
92. Malkin, D. Li-fraumeni syndrome. *Genes Cancer* **2**, 475–484 (2011).
93. Tung, N. M. & Garber, J. E. BRCA1/2 testing: therapeutic implications for breast cancer management. *Br J Cancer* **119**, 141–152 (2018).
94. Pogrebniak, K. L. & Curtis, C. Harnessing Tumor Evolution to Circumvent Resistance. *Trends Genet* **34**, 639–651 (2018).
95. Mills, J. C., Stanger, B. Z. & Sander, M. Nomenclature for cellular plasticity: are the terms as plastic as the cells themselves? *EMBO J* **38**, e103148 (2019).
96. Boumahdi, S. & de Sauvage, F. J. The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. *Nat Rev Drug Discov* **19**, 39–56 (2020).
97. PCAWG Transcriptome Core Group *et al.* Genomic basis for RNA alterations in cancer. *Nature* **578**, 129–136 (2020).
98. Kemper, K. *et al.* Intra- and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts. *EMBO Mol Med* **7**, 1104–1118 (2015).
99. Baumeister, P., Zhou, J., Canis, M. & Gires, O. Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Derived Heterogeneity in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancers (Basel)* **13**, 5355 (2021).
100. Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
101. Sasaki, K. *et al.* Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* **28**, 158 (2009).
102. Rambow, F., Marine, J.-C. & Goding, C. R. Melanoma plasticity and phenotypic

- diversity: therapeutic barriers and opportunities. *Genes Dev* **33**, 1295–1318 (2019).
103. Dentre, S. C., Wedge, D. C. & Van Loo, P. Principles of Reconstructing the Subclonal Architecture of Cancers. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, (2017).
104. Roth, A. *et al.* PyClone: statistical inference of clonal population structure in cancer. *Nat Methods* **11**, 396–398 (2014).
105. Miller, C. A. *et al.* SciClone: inferring clonal architecture and tracking the spatial and temporal patterns of tumor evolution. *PLoS Comput Biol* **10**, e1003665 (2014).
106. Deshwar, A. G. *et al.* PhyloWGS: reconstructing subclonal composition and evolution from whole-genome sequencing of tumors. *Genome Biol* **16**, 35 (2015).
107. Jiao, W., Vembu, S., Deshwar, A. G., Stein, L. & Morris, Q. Inferring clonal evolution of tumors from single nucleotide somatic mutations. *BMC Bioinformatics* **15**, 35 (2014).
108. Van Loo, P. *et al.* Allele-specific copy number analysis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 16910–16915 (2010).
109. Carter, S. L. *et al.* Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat Biotechnol* **30**, 413–421 (2012).
110. Nik-Zainal, S. *et al.* The life history of 21 breast cancers. *Cell* **149**, 994–1007 (2012).
111. Ha, G. *et al.* TITAN: inference of copy number architectures in clonal cell populations from tumor whole-genome sequence data. *Genome Res* **24**, 1881–1893 (2014).
112. Fischer, A., Vázquez-García, I., Illingworth, C. J. R. & Mustonen, V. High-definition reconstruction of clonal composition in cancer. *Cell Rep* **7**, 1740–1752 (2014).
113. Shen, R. & Seshan, V. E. FACETS: allele-specific copy number and clonal heterogeneity analysis tool for high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* **44**, e131 (2016).
114. Davis, C. F. *et al.* The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Cell* **26**, 319–330 (2014).
115. Beerenwinkel, N., Schwarz, R. F., Gerstung, M. & Markowetz, F. Cancer evolution: mathematical models and computational inference. *Syst Biol* **64**, e1-25 (2015).
116. Jolly, C. & Van Loo, P. Timing somatic events in the evolution of cancer. *Genome Biol* **19**, 95 (2018).
117. Gerstung, M. *et al.* The evolutionary history of 2,658 cancers. *Nature* **578**, 122–128 (2020).
118. Zhang, X. C. *et al.* Tumor evolution and intratumor heterogeneity of an oropharyngeal squamous cell carcinoma revealed by whole-genome sequencing. *Neoplasia* **15**, 1371–1378 (2013).

119. Zhang, J. *et al.* Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science* **346**, 256–259 (2014).
120. McGranahan, N., Burrell, R. A., Endesfelder, D., Novelli, M. R. & Swanton, C. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges. *EMBO Rep* **13**, 528–538 (2012).
121. Sato, Y. *et al.* Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet* **45**, 860–867 (2013).
122. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* **499**, 43–49 (2013).
123. Scelo, G. *et al.* Variation in genomic landscape of clear cell renal cell carcinoma across Europe. *Nat Commun* **5**, 5135 (2014).
124. de Bruin, E. C. *et al.* Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science* **346**, 251–256 (2014).
125. Yates, L. R. *et al.* Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat Med* **21**, 751–759 (2015).
126. Barry, P. *et al.* The Spatiotemporal Evolution of Lymph Node Spread in Early Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **24**, 4763–4770 (2018).
127. Sottoriva, A. *et al.* Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 4009–4014 (2013).
128. Spiteri, I. *et al.* Evolutionary dynamics of residual disease in human glioblastoma. *Ann Oncol* **30**, 456–463 (2019).
129. Cross, W. *et al.* The evolutionary landscape of colorectal tumorigenesis. *Nat Ecol Evol* **2**, 1661–1672 (2018).
130. Zong, C., Lu, S., Chapman, A. R. & Xie, X. S. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science* **338**, 1622–1626 (2012).
131. Davis, A. & Navin, N. E. Computing tumor trees from single cells. *Genome Biol* **17**, 113 (2016).
132. Roth, A. *et al.* Clonal genotype and population structure inference from single-cell tumor sequencing. *Nat Methods* **13**, 573–576 (2016).
133. Salehi, S. *et al.* ddClone: joint statistical inference of clonal populations from single cell and bulk tumour sequencing data. *Genome Biol* **18**, 44 (2017).
134. Zahn, H. *et al.* Scalable whole-genome single-cell library preparation without preamplification. *Nat Methods* **14**, 167–173 (2017).
135. Hou, Y. *et al.* Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-

- negative myeloproliferative neoplasm. *Cell* **148**, 873–885 (2012).
136. Wang, Y. *et al.* Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature* **512**, 155–160 (2014).
137. Abbosh, C. *et al.* Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature* **545**, 446–451 (2017).
138. Bratman, S. V. *et al.* Personalized circulating tumor DNA analysis as a predictive biomarker in solid tumor patients treated with pembrolizumab. *Nat Cancer* **1**, 873–881 (2020).
139. TRACERx Renal consortium. TRACERx Renal: tracking renal cancer evolution through therapy. *Nat Rev Urol* **14**, 575–576 (2017).
140. Fujiwara, T. *et al.* Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* **437**, 1043–1047 (2005).
141. Martinez, P. *et al.* Parallel evolution of tumour subclones mimics diversity between tumours. *J Pathol* **230**, 356–364 (2013).
142. Watkins, T. B. K. *et al.* Pervasive chromosomal instability and karyotype order in tumour evolution. *Nature* **587**, 126–132 (2020).
143. Weaver, B. A. A., Silk, A. D., Montagna, C., Verdier-Pinard, P. & Cleveland, D. W. Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell* **11**, 25–36 (2007).
144. Lynch, M., Bürger, R., Butcher, D. & Gabriel, W. The mutational meltdown in asexual populations. *J Hered* **84**, 339–344 (1993).
145. Roylance, R. *et al.* Relationship of extreme chromosomal instability with long-term survival in a retrospective analysis of primary breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**, 2183–2194 (2011).
146. Birnbak, N. J. *et al.* Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. *Cancer Res* **71**, 3447–3452 (2011).
147. Jamal-Hanjani, M. *et al.* Extreme chromosomal instability forecasts improved outcome in ER-negative breast cancer: a prospective validation cohort study from the TACT trial. *Ann Oncol* **26**, 1340–1346 (2015).
148. Schwarz, R. F. *et al.* Spatial and temporal heterogeneity in high-grade serous ovarian cancer: a phylogenetic analysis. *PLoS Med* **12**, e1001789 (2015).
149. Andor, N. *et al.* Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. *Nat Med* **22**, 105–113 (2016).
150. Hochhaus, A. *et al.* Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **376**, 917–927 (2017).
151. Offin, M. *et al.* Tumor Mutation Burden and Efficacy of EGFR-Tyrosine Kinase

Inhibitors in Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin Cancer Res* **25**, 1063–1069 (2019).

152. Hata, A. N. *et al.* Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat Med* **22**, 262–269 (2016).

153. Bozic, I. & Nowak, M. A. Timing and heterogeneity of mutations associated with drug resistance in metastatic cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 15964–15968 (2014).

154. Ahn, I. E. *et al.* Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **129**, 1469–1479 (2017).

155. Bettegowda, C. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* **6**, 224ra24 (2014).

156. Shi, H. *et al.* Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov* **4**, 80–93 (2014).

157. Pearson, A. *et al.* High-Level Clonal FGFR Amplification and Response to FGFR Inhibition in a Translational Clinical Trial. *Cancer Discov* **6**, 838–851 (2016).

158. Yap, T. A., Gerlinger, M., Futreal, P. A., Pusztai, L. & Swanton, C. Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Sci Transl Med* **4**, 127ps10 (2012).

159. Cao, W. *et al.* Multiple region whole-exome sequencing reveals dramatically evolving intratumor genomic heterogeneity in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogenesis* **4**, e175 (2015).

160. Voss, M. H. *et al.* Tumor genetic analyses of patients with metastatic renal cell carcinoma and extended benefit from mTOR inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* **20**, 1955–1964 (2014).

161. Wei, E. Y. & Hsieh, J. J. A river model to map convergent cancer evolution and guide therapy in RCC. *Nat Rev Urol* **12**, 706–712 (2015).

162. Sun, C. *et al.* Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* **508**, 118–122 (2014).

163. Siravegna, G. *et al.* Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med* **21**, 827 (2015).

164. Turajlic, S., Sottoriva, A., Graham, T. & Swanton, C. Resolving genetic heterogeneity in cancer. *Nat Rev Genet* **20**, 404–416 (2019).

165. Chow, L. Q. M. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* **382**, 60–72 (2020).

166. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394–424 (2018).

167. Mourad, M. *et al.* Epidemiological Trends of Head and Neck Cancer in the United

- States: A SEER Population Study. *J Oral Maxillofac Surg* **75**, 2562–2572 (2017).
168. Global Burden of Disease Cancer Collaboration *et al.* Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* **5**, 1749–1768 (2019).
169. Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F. & Fakhry, C. Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* **33**, 3235–3242 (2015).
170. Gupta, B., Johnson, N. W. & Kumar, N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology* **91**, 13–23 (2016).
171. Deschler, D. G., Richmon, J. D., Khariwala, S. S., Ferris, R. L. & Wang, M. B. The ‘new’ head and neck cancer patient-young, nonsmoker, nondrinker, and HPV positive: evaluation. *Otolaryngol Head Neck Surg* **151**, 375–380 (2014).
172. Mirghani, H. *et al.* Prevalence and characteristics of HPV-driven oropharyngeal cancer in France. *Cancer Epidemiol* **61**, 89–94 (2019).
173. Ang, K. K. *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 24–35 (2010).
174. Amin, M. B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more ‘personalized’ approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* **67**, 93–99 (2017).
175. Lydiatt, W. M. *et al.* Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* **67**, 122–137 (2017).
176. O’Sullivan, B. *et al.* Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol* **17**, 440–451 (2016).
177. Porceddu, S. V. *et al.* Validation of the ICON-S staging for HPV-associated oropharyngeal carcinoma using a pre-defined treatment policy. *Oral Oncol* **66**, 81–86 (2017).
178. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**, 576–582 (2015).
179. Keck, M. K. *et al.* Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clin Cancer Res* **21**, 870–881 (2015).
180. Stransky, N. *et al.* The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **333**, 1157–1160 (2011).

181. Agrawal, N. *et al.* Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* **333**, 1154–1157 (2011).
182. Marret, G. *et al.* Genomic Alterations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Level of Evidence According to ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT). *JCO Precis Oncol* **5**, 215–226 (2021).
183. Pfister, D. G. *et al.* Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* **18**, 873–898 (2020).
184. Braakhuis, B. J. M., Brakenhoff, R. H. & Leemans, C. R. Treatment choice for locally advanced head and neck cancers on the basis of risk factors: biological risk factors. *Ann Oncol* **23 Suppl 10**, x173-177 (2012).
185. Blanchard, P. *et al.* Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site. *Radiother Oncol* **100**, 33–40 (2011).
186. Vokes, E. E., Agrawal, N. & Seiwert, T. Y. HPV-Associated Head and Neck Cancer. *J Natl Cancer Inst* **107**, djv344 (2015).
187. Cheraghlou, S. *et al.* Treatment deintensification in human papillomavirus-positive oropharynx cancer: Outcomes from the National Cancer Data Base. *Cancer* **124**, 717–726 (2018).
188. Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D. & Ferris, R. L. Head and neck cancer. *Lancet* **371**, 1695–1709 (2008).
189. Lefebvre, J.-L. Current clinical outcomes demand new treatment options for SCCHN. *Ann Oncol* **16 Suppl 6**, vi7–vi12 (2005).
190. Citri, A. & Yarden, Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 505–516 (2006).
191. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 127–137 (2001).
192. Nicholson, R. I., Gee, J. M. & Harper, M. E. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**, S9-15 (2001).
193. Zimmermann, M., Zouhair, A., Azria, D. & Ozsahin, M. The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. *Radiat Oncol* **1**, 11 (2006).
194. Pérez-Soler, R. HER1/EGFR targeting: refining the strategy. *Oncologist* **9**, 58–67 (2004).
195. Britten, C. D. Targeting ErbB receptor signaling: a pan-ErbB approach to cancer. *Mol Cancer Ther* **3**, 1335–1342 (2004).

196. Martinelli, E., De Palma, R., Orditura, M., De Vita, F. & Ciardiello, F. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol* **158**, 1–9 (2009).
197. Brand, T. M., Iida, M. & Wheeler, D. L. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther* **11**, 777–792 (2011).
198. Bonner, J. A. *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol.* **11**, 21–28 (2010).
199. Vermorcken, J. B. *et al.* Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1116–1127 (2008).
200. Vermorcken, J. B. *et al.* Open-label, uncontrolled, multicenter phase II study to evaluate the efficacy and toxicity of cetuximab as a single agent in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck who failed to respond to platinum-based therapy. *J. Clin. Oncol.* **25**, 2171–2177 (2007).
201. Wheeler, D. L. *et al.* Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* **27**, 3944–3956 (2008).
202. Cohen, E. E. W. *et al.* Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* **21**, 1980–1987 (2003).
203. Marquez-Medina, D. & Popat, S. Afatinib: a second-generation EGF receptor and ErbB tyrosine kinase inhibitor for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Future Oncol* **11**, 2525–2540 (2015).
204. Seiwert, T. Y. *et al.* A randomized, phase II study of afatinib versus cetuximab in metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* **25**, 1813–1820 (2014).
205. Iida, M. *et al.* Targeting the HER Family with Pan-HER Effectively Overcomes Resistance to Cetuximab. *Mol Cancer Ther* **15**, 2175–2186 (2016).
206. Yang, Z. *et al.* Comparison of gefitinib, erlotinib and afatinib in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Int J Cancer* **140**, 2805–2819 (2017).
207. Paz-Ares, L. *et al.* Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol* **28**, 270–277 (2017).
208. Machiels, J.-P. H. *et al.* Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): an open-label, randomised phase 3

trial. *Lancet Oncol.* **16**, 583–594 (2015).

209. Cohen, E. E. W. *et al.* Biomarkers predict enhanced clinical outcomes with afatinib versus methotrexate in patients with second-line recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Ann. Oncol.* **28**, 2526–2532 (2017).

210. Machiels, J.-P. *et al.* Activity and safety of afatinib in a window preoperative EORTC study in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Ann Oncol* **29**, 985–991 (2018).

211. Ferris, R. L. *et al.* Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1856–1867 (2016).

212. Cohen, E. E. W. *et al.* Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* **393**, 156–167 (2019).

213. Burtneess, B. *et al.* Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* **394**, 1915–1928 (2019).

214. Mroz, E. A. & Rocco, J. W. MATH, a novel measure of intratumor genetic heterogeneity, is high in poor-outcome classes of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **49**, 211–215 (2013).

215. Poeta, M. L. *et al.* TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2552–2561 (2007).

216. Smeets, S. J. *et al.* Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene* **25**, 2558–2564 (2006).

217. Marur, S., D’Souza, G., Westra, W. H. & Forastiere, A. A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* **11**, 781–789 (2010).

218. Mroz, E. A. *et al.* High intratumor genetic heterogeneity is related to worse outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* **119**, 3034–3042 (2013).

219. Mroz, E. A. *et al.* Intra-tumor genetic heterogeneity and mortality in head and neck cancer: analysis of data from the Cancer Genome Atlas. *PLoS Med.* **12**, e1001786 (2015).

220. Ciriello, G. *et al.* Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat. Genet.* **45**, 1127–1133 (2013).

221. Mroz, E. A., Patel, K. B. & Rocco, J. W. Intratumor heterogeneity could inform the use and type of postoperative adjuvant therapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* **126**, 1895–1904 (2020).

222. Patel, K. B., Mroz, E. A., Faquin, W. C. & Rocco, J. W. A combination of intra-tumor genetic heterogeneity, estrogen receptor alpha and human papillomavirus status predicts outcomes in head and neck squamous cell carcinoma following chemoradiotherapy. *Oral Oncol* **120**, 105421 (2021).
223. Pereira, B. *et al.* The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun* **7**, 11479 (2016).
224. Espiritu, S. M. G. *et al.* The Evolutionary Landscape of Localized Prostate Cancers Drives Clinical Aggression. *Cell* **173**, 1003-1013.e15 (2018).
225. Leung, M. L. *et al.* Single-cell DNA sequencing reveals a late-dissemination model in metastatic colorectal cancer. *Genome Res* **27**, 1287–1299 (2017).
226. Hedberg, M. L. *et al.* Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* **126**, 169–180 (2016).
227. Melchardt, T. *et al.* Clonal evolution and heterogeneity in metastatic head and neck cancer-An analysis of the Austrian Study Group of Medical Tumour Therapy study group. *Eur J Cancer* **93**, 69–78 (2018).
228. Sim, N. S. *et al.* Investigation of somatic mutation profiles and tumor evolution of primary oropharyngeal cancer and sequential lymph node metastases using multiregional whole-exome sequencing. *Mol Oncol* **17**, 981–992 (2023).
229. Wang, L. *et al.* Intratumoural heterogeneity and clone evolution of oral squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* **60**, 758–768 (2021).
230. Tabatabaeifar, S. *et al.* The subclonal structure and genomic evolution of oral squamous cell carcinoma revealed by ultra-deep sequencing. *Oncotarget* **8**, 16571–16580 (2017).
231. Puram, S. V. *et al.* Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell* **171**, 1611-1624.e24 (2017).
232. Arora, R. *et al.* Spatial transcriptomics reveals distinct and conserved tumor core and edge architectures that predict survival and targeted therapy response. *Nat Commun* **14**, 5029 (2023).
233. Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425 (1987).
234. Zhu, W. *et al.* BubbleTree: an intuitive visualization to elucidate tumoral aneuploidy and clonality using next generation sequencing data. *Nucleic Acids Res* **44**, e38 (2016).
235. Yachida, S. *et al.* Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**, 1114–1117 (2010).
236. McGranahan, N. *et al.* Clonal status of actionable driver events and the timing of

- mutational processes in cancer evolution. *Sci Transl Med* **7**, 283ra54 (2015).
237. Notta, F. *et al.* A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature* **538**, 378–382 (2016).
238. Field, M. G. *et al.* Punctuated evolution of canonical genomic aberrations in uveal melanoma. *Nat Commun* **9**, 116 (2018).
239. Turajlic, S. *et al.* Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell* **173**, 581–594.e12 (2018).
240. Krøigård, A. B. *et al.* Clonal expansion and linear genome evolution through breast cancer progression from pre-invasive stages to asynchronous metastasis. *Oncotarget* **6**, 5634–5649 (2015).
241. Gudem, G. *et al.* The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* **520**, 353–357 (2015).
242. Navin, N. E. The first five years of single-cell cancer genomics and beyond. *Genome Res* **25**, 1499–1507 (2015).
243. Tanay, A. & Regev, A. Scaling single-cell genomics from phenomenology to mechanism. *Nature* **541**, 331–338 (2017).
244. Sablin, M.-P. *et al.* Identification of new candidate therapeutic target genes in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget* **7**, 47418–47430 (2016).
245. Dubot, C. *et al.* Comprehensive genomic profiling of head and neck squamous cell carcinoma reveals FGFR1 amplifications and tumour genomic alterations burden as prognostic biomarkers of survival. *Eur J Cancer* **91**, 47–55 (2018).
246. Lecerf, C. *et al.* Immune gene expression in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Eur J Cancer* **121**, 210–223 (2019).
247. Hoffmann, C. *et al.* MMP2 as an independent prognostic stratifier in oral cavity cancers. *Oncoimmunology* **9**, 1754094 (2020).
248. Leblanc, O. *et al.* Biomarkers of cetuximab resistance in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Med* **17**, 208–217 (2020).
249. Moreira, A. *et al.* Prognostic value of tumor mutational burden in patients with oral cavity squamous cell carcinoma treated with upfront surgery. *ESMO Open* **6**, 100178 (2021).
250. Neuzillet, C. *et al.* Prognostic value of intratumoral *Fusobacterium nucleatum* and association with immune-related gene expression in oral squamous cell carcinoma patients. *Sci Rep* **11**, 7870 (2021).
251. Galot, R. *et al.* Personalized biomarker-based treatment strategy for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: EORTC position and approach. *Ann. Oncol.*

29, 2313–2327 (2018).

252. Reiter, J. G. *et al.* Minimal functional driver gene heterogeneity among untreated metastases. *Science* **361**, 1033–1037 (2018).

253. Bedard, P. L., Hansen, A. R., Ratain, M. J. & Siu, L. L. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature* **501**, 355–364 (2013).

254. Hiley, C., de Bruin, E. C., McGranahan, N. & Swanton, C. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. *Genome Biol* **15**, 453 (2014).

255. Zhang, X. C. *et al.* Tumor evolution and intratumor heterogeneity of an oropharyngeal squamous cell carcinoma revealed by whole-genome sequencing. *Neoplasia* **15**, 1371–1378 (2013).

256. Tivey, A., Church, M., Rothwell, D., Dive, C. & Cook, N. Circulating tumour DNA - looking beyond the blood. *Nat Rev Clin Oncol* **19**, 600–612 (2022).

257. Lone, S. N. *et al.* Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer* **21**, 79 (2022).

258. Economopoulou, P. *et al.* Next-generation sequencing (NGS) profiling of matched tumor and circulating tumor DNA (ctDNA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Oral Oncol* **139**, 106358 (2023).

259. Galot, R. *et al.* Liquid biopsy for mutational profiling of locoregional recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **104**, 104631 (2020).

260. Johnson, F. M. *et al.* Inhibition of the Phosphatidylinositol-3 Kinase Pathway Using Bimiralisib in Loss-of-Function NOTCH1-Mutant Head and Neck Cancer. *Oncologist* **27**, 1004-e926 (2022).

261. Braig, F. *et al.* Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, 42988–42995 (2016).

262. Leemans, C. R., Snijders, P. J. F. & Brakenhoff, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 269–282 (2018).

263. Lechner, M. *et al.* Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors. *Genome Med* **5**, 49 (2013).

264. Li, X. *et al.* Clinicopathologic risk factors for distant metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *Eur J Surg Oncol* **35**, 1348–1353 (2009).

265. de Ruiter, E. J. *et al.* Comparison of three PD-L1 immunohistochemical assays in head

- and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Mod Pathol* **34**, 1125–1132 (2021).
266. Chakravarty, D. *et al.* OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis Oncol* **2017**, PO.17.00011 (2017).
267. Mayakonda, A., Lin, D.-C., Assenov, Y., Plass, C. & Koeffler, H. P. Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. *Genome Res* **28**, 1747–1756 (2018).
268. Robinson, M. D. & Oshlack, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* **11**, R25 (2010).
269. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* **43**, e47 (2015).
270. Raudvere, U. *et al.* g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* **47**, W191–W198 (2019).
271. Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M. & Tanabe, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res* **40**, D109–114 (2012).
272. Croft, D. *et al.* Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes. *Nucleic Acids Res* **39**, D691–697 (2011).
273. Nguyen, N. *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* **38**, 1074–1084 (2016).
274. de Ruiter, E. J., Ooft, M. L., Devriese, L. A. & Willems, S. M. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology* **6**, e1356148 (2017).
275. Bailey, C. *et al.* Tracking Cancer Evolution through the Disease Course. *Cancer Discov* **11**, 916–932 (2021).
276. Becht, E. *et al.* Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol.* **17**, 218 (2016).
277. Malikic, S., McPherson, A. W., Donmez, N. & Sahinalp, C. S. Clonality inference in multiple tumor samples using phylogeny. *Bioinformatics* **31**, 1349–1356 (2015).
278. van Ginkel, J. H., Huibers, M. M. H., van Es, R. J. J., de Bree, R. & Willems, S. M. Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of head and neck cancer patients. *BMC Cancer* **17**, 428 (2017).
279. Jonas, H. *et al.* Early relapse detection by monitoring of circulating cell-free DNA in patients with localized head and neck squamous cell carcinoma: A subgroup analysis of the multicenter randomized clinical trial IMSTAR-HN. *Oral Oncol* **126**, 105733 (2022).
280. Flach, S. *et al.* Liquid BIOPsy for MiNimal RESidual DiSease Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (LIONESS)-a personalised circulating tumour DNA analysis

- in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **126**, 1186–1195 (2022).
281. Egyud, M. *et al.* Plasma circulating tumor DNA as a potential tool for disease monitoring in head and neck cancer. *Head Neck* **41**, 1351–1358 (2019).
282. Kogo, R. *et al.* Individualized circulating tumor DNA monitoring in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med* **11**, 3960–3968 (2022).
283. Soulières, D. *et al.* Molecular Alterations and Buparlisib Efficacy in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Biomarker Analysis from BERIL-1. *Clin. Cancer Res.* **24**, 2505–2516 (2018).
284. Hanna, G. J. *et al.* Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer. *Ann Oncol* **29**, 1980–1986 (2018).
285. Fakhry, C. *et al.* Association of Oral Human Papillomavirus DNA Persistence With Cancer Progression After Primary Treatment for Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Oncol* **5**, 985–992 (2019).
286. Akashi, K. *et al.* Usefulness of circulating tumor DNA by targeting human papilloma virus-derived sequences as a biomarker in p16-positive oropharyngeal cancer. *Sci Rep* **12**, 572 (2022).
287. Chera, B. S. *et al.* Plasma Circulating Tumor HPV DNA for the Surveillance of Cancer Recurrence in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *J Clin Oncol* **38**, 1050–1058 (2020).
288. Berger, B. M. *et al.* Detection of Occult Recurrence Using Circulating Tumor Tissue Modified Viral HPV DNA among Patients Treated for HPV-Driven Oropharyngeal Carcinoma. *Clin Cancer Res* **28**, 4292–4301 (2022).
289. Soulieres, D. *et al.* Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol* **22**, 77–85 (2004).
290. de Souza, J. A. *et al.* A phase II study of lapatinib in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2336–2343 (2012).
291. Segal, N. H. *et al.* Safety and efficacy of durvalumab in patients with head and neck squamous cell carcinoma: results from a phase I/II expansion cohort. *Eur J Cancer* **109**, 154–161 (2019).
292. Ferris, R. L. *et al.* Durvalumab with or without tremelimumab in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: EAGLE, a randomized, open-label phase III study. *Ann Oncol* **31**, 942–950 (2020).
293. Siu, L. L. *et al.* Safety and Efficacy of Durvalumab With or Without Tremelimumab in Patients With PD-L1-Low/Negative Recurrent or Metastatic HNSCC: The Phase 2 CONDOR

Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* **5**, 195–203 (2019).

294. Kalinsky, K. & Hershman, D. L. Cracking open window of opportunity trials. *J Clin Oncol* **30**, 2573–2575 (2012).

295. Li, D. *et al.* BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* **27**, 4702–4711 (2008).

296. Solca, F. *et al.* Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J Pharmacol Exp Ther* **343**, 342–350 (2012).

297. Finotello, F. *et al.* Molecular and pharmacological modulators of the tumor immune contexture revealed by deconvolution of RNA-seq data. *Genome Med* **11**, 34 (2019).

298. Chen, W. S. *et al.* CDKN2A Copy Number Loss Is an Independent Prognostic Factor in HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol* **8**, 95 (2018).

299. Marret, G., Borcoman, E. & Le Tourneau, C. Window-of-opportunity clinical trials for biomarker discovery in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* **35**, 158–165 (2023).

300. Wessels, S. *et al.* Comprehensive serial biobanking in advanced NSCLC: feasibility, challenges and perspectives. *Transl Lung Cancer Res* **9**, 1000–1014 (2020).

301. Abdollahyan, M. *et al.* Dynamic Biobanking for Advancing Breast Cancer Research. *J Pers Med* **13**, 360 (2023).

302. De Gregorio, A. *et al.* Feasibility of a large multi-center translational research project for newly diagnosed breast and ovarian cancer patients with affiliated biobank: the BRandO biology and outcome (BiO)-project. *Arch Gynecol Obstet* **301**, 273–281 (2020).

RÉSUMÉ

Les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (CETC) sont la septième cause de cancer dans le monde. En situation de récurrence et/ou métastatique, le pronostic des patients est sombre avec une médiane de survie d'une année en l'absence de traitement. Le cetuximab, un anticorps monoclonal ciblant l'EGFR, est la seule thérapie ciblée approuvée dont l'efficacité en monothérapie reste marginale en l'absence de biomarqueurs disponibles.

Les altérations (épi)génétiques qui s'accumulent diversement dans les cellules malignes génèrent des sous-clones évoluant dans des niches géographiques distinctes (à l'origine d'une hétérogénéité intra-tumorale spatiale) et dont l'importance relative évolue au cours du temps sous la pression de sélection naturelle et thérapeutique (à l'origine d'une hétérogénéité intra-tumorale temporelle). Les études disponibles dans les CETC s'accordent sur l'omniprésence d'une hétérogénéité génétique intra-tumorale dont l'importance semble corrélée à une diminution de la survie globale et à une augmentation du risque d'évolution métastatique. Ces données établies majoritairement sur l'analyse d'une seule biopsie sous-estiment la part d'hétérogénéité spatiale et temporelle d'une tumeur.

Les objectifs de cette thèse étaient les suivants : (i) caractériser l'hétérogénéité génétique spatiale des CETC localisés, (ii) caractériser l'hétérogénéité temporelle qui émerge au cours de la récurrence tumorale représentée par l'ADN tumoral circulant (ctDNA) et sous thérapie ciblée et (iii) préciser la valeur pronostique de l'hétérogénéité intra-tumorale spatiale dans les CETC localisés et d'une maladie résiduelle minimale basée sur la détection du ctDNA dans les CETC opérés.

Nous avons validé la faisabilité d'un séquençage multirégional du génome et du transcriptome d'une tumeur primitive guidé par l'annotation spatiale de ses régions histologiquement peu et bien différenciées. Un score d'hétérogénéité pathologique était calculé pour chaque patient corrélant significativement à des profils d'expression différentielle de gènes impliqués dans les voies de signalisation de la jonction cellulaire. Nous avons rapporté une hétérogénéité génomique chez 37% des patients suivis pour un CETC localisé. Nous montrons que la présence d'une hétérogénéité spatiale a des implications thérapeutiques puisque 32% d'entre eux auraient bénéficié d'une thérapie ciblée différente suivant la région tumorale biopsiée.

L'analyse comparée des génomes des tumeurs primitives et des ctDNA prélevés de façon répétée a conforté l'existence d'une hétérogénéité spatiale chez 14% des patients suivis pour un CETC initialement localisé et a montré l'émergence de nouvelles mutations au cours du temps dans 43% des cas. Les mutations détectées dans le plasma et impliquées dans l'hétérogénéité intra-tumorale étaient pour la plupart actionnables suggérant l'applicabilité du ctDNA à la médecine de précision. Nous montrons que le ctDNA est un biomarqueur de maladie résiduelle minimale dont la détection postopératoire corrèle à une augmentation du risque de récurrence.

Nos travaux ont identifié des biomarqueurs pharmacodynamiques de l'activité de l'afatinib (un inhibiteur de tyrosine kinase pan-HER) administré en préopératoire dans des CETC localisés. Ces biomarqueurs étaient définis au niveau cellulaire par des changements de la composition du micro-environnement tumoral en lymphocytes B et au niveau moléculaire par l'activité de la voie de signalisation NF- κ B.

En définitive, les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont permis de caractériser l'importance de l'hétérogénéité génétique qui existe dans des CETC localisés et émergeant au cours de la progression tumorale et sous traitement, d'en appréhender l'impact en termes de médecine de précision et d'en préciser les déterminants moléculaires et cellulaires concourants à l'identification de nouveaux biomarqueurs tissulaires et circulants.

MOTS CLÉS

Cancers ORL ; Hétérogénéité intra-tumorale ; Biomarqueurs ; Séquençage haut débit ; ADN tumoral circulant ; Evolution du cancer

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the seventh most common cancer worldwide. Patients experiencing a recurrence that is not amenable to surgery or radiotherapy have a limited overall survival, with a median survival of less than one year in the absence of treatment. Overexpression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) is a common characteristic of HNSCC and is associated with poor outcomes. EGFR-targeted therapies, including monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors, have achieved only modest success in recurrent and/or metastatic HNSCC, yet without prior patients' selection. To date, there remains no strong and reliable predictive biomarkers for EGFR inhibitors in HNSCC.

A malignant tumor emerges and evolves as a consequence of (epi)genetic damages that accumulate in a cell. These damages generate a major clone and a number of sub-clones. Upon a multiform selective pressure, a great diversity of individual cells and cellular subpopulations can appear within a tumor (leading to spatial heterogeneity), that are further affected by spatial dynamics and clonal evolution (leading to temporal heterogeneity). A few next-generation sequencing (NGS)-based studies have reported that genetic heterogeneity is pervasive in HNSCC, while higher heterogeneity portended worse clinical outcome. However, these findings mostly rely on genomic analyses from single tumor-biopsy specimens which may underestimate the mutational burden of heterogeneous tumors.

The aims of this work were firstly to investigate the genetic intratumor heterogeneity portrayed from multiregion spatial sequencing in early-stage HNSCC patients treated with upfront curative-intent surgery. Secondly, we wanted to characterize the temporal heterogeneity that emerge during disease progression, as captured in serial circulating tumor DNA (ctDNA), as well as therapy-induced heterogeneity of treatment-naïve HNSCC tumors through pharmacodynamic analyses. Third, we sought to refine the prognostic value of intratumor heterogeneity in early-stage HNSCC patients.

We successfully performed multiregion spatial sequencing based on pathological annotation of poorly and well-differentiated intratumor regions. We set up a pathological heterogeneity score, which accounted for a significant source of variation in gene expression. Notably, differentially expressed genes were involved in several Reactome's signaling pathways, including the cell junction organization and the tight junction interaction pathways. We observed widespread genomic intratumor heterogeneity in 37% of early-stage HNSCC patients, of whom 32% with actionable molecular alterations.

Targeted NGS on serial ctDNA revealed spatial and temporal intra-tumor heterogeneity in respectively 14% and 43% of early-stage HNSCC patients that may complement a single tumor biopsy for guiding precision medicine. The detection of minimal residual disease through ctDNA mutation tracking within 14 weeks after the definitive surgery was a strong and independent predictor for disease recurrence.

We reported pharmacodynamic biomarkers of activity of afatinib (a second-generation pan-HER tyrosine kinase inhibitor), which were defined at the cellular level by B cells changes in the tumor microenvironment, and at the molecular level by NF- κ B signaling activity.

In conclusion, we showed substantial clinically relevant genetic intratumor heterogeneity at the time of the curative-intent surgery, during disease progression and between pretreatment and posttreatment tumor tissues in early-stage, operable HNSCC patients. Our findings shed light on the molecular and cellular features that foster tumor heterogeneity in an attempt to address the challenge of biomarkers research in Head and Neck oncology.

KEYWORDS

Head and neck cancer; Tumor heterogeneity; Biomarkers; Next generation sequencing; Circulating tumor DNA; Tumor evolution