

# Inserm

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

UNIVERSITE  
PAUL  
SABATIER



TOULOUSE III



Groupe Hospitalier  
RANGUEIL-LARREY

## Les outils biologiques en pratique : aide au diagnostic, au pronostic et au traitement du cancer bronchique

**Julien Mazières**

**Unité d'Oncologie Cervico-Thoracique**

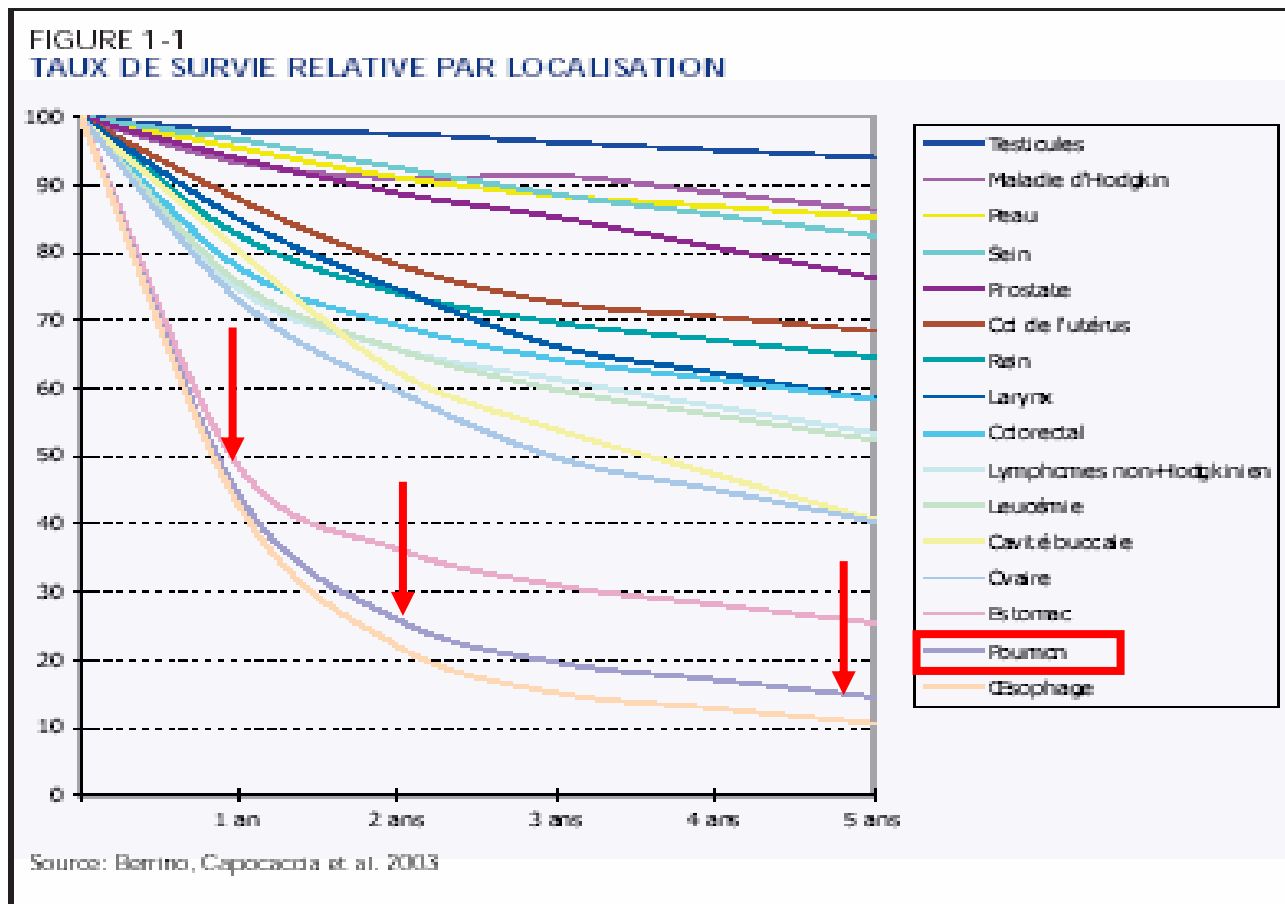
**Pole des Voies Respiratoires**

**Hôpital Larrey**

**CHU Toulouse**

# La biologie des cancers bronchiques

Quelle est l'utilité des marqueurs biologiques ?  
Mauvais pronostic du CBNPC



# La biologie..en pratique

Matériel	Analyse	Utilisation
Tumeur	ADN	dépistage
Biopsie	ARNm	diagnostic
Sang	microARN	pronostic
Sputum	épigénétique	prédictif
Air exhalé	Protéines	traitement

# La biologie..en pratique

## Matériel

Tumeur

Biopsie

Sang

Sputum

Air exhalé

## Analyse

ADN

ARNm

microARN

épigénétique

Protéines

## Utilisation

dépistage

diagnostic

pronostic

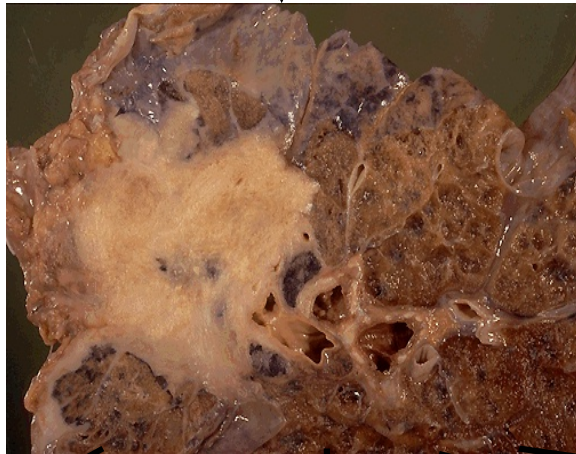
prédictif

traitement

# Matériel : la tumeur



**Recueil d'information du patient**  
**Transmission des informations**  
**chirurgien – anatomopathologiste**  
**Respect des délais de transfert de**  
**la pièce opératoire (< 30 minutes)**  
**Fixation dans milieu adapté aux**  
**études ultérieures**  
**Congélation à – 80°C**  
**Possibilité de fixation /**  
**congélation au bloc opératoire**



**Analyse**  
**macroscopique**

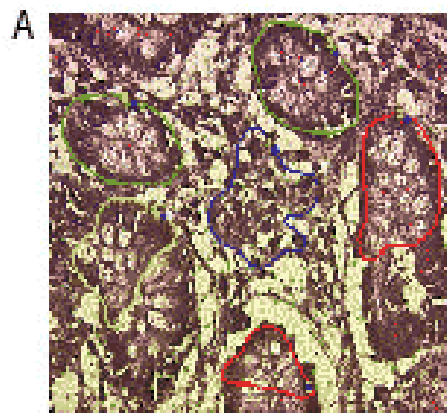
**Immuno-**  
**histochimie**

**Analyse**  
**ADN/ARN**

**Analyse**  
**protéines**

# Matériel : la tumeur

## Microdissection

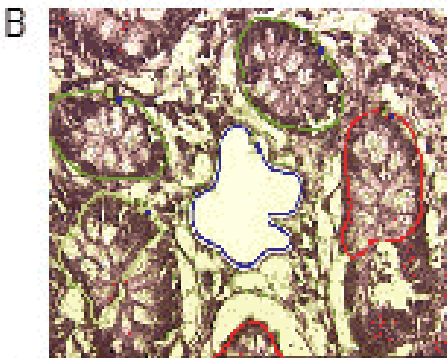


1. Laser Microdissection and Pressure Catapulting (LMPC)

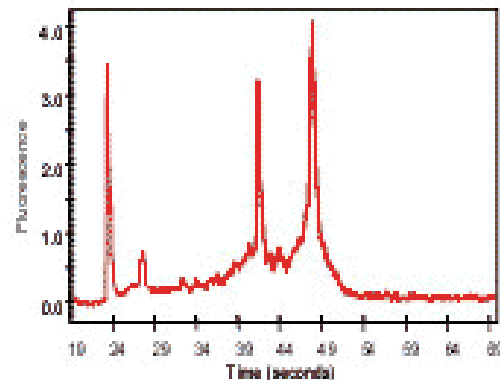
A. Laser microdissection

B. Laser pressure catapulting: Section after catapulting of selected area

C. Catapulted area in the collection device



2. RNA Sample QC using 2100 bioanalyzer and RNA 6000 Pico LabChip kit



RNA extraction

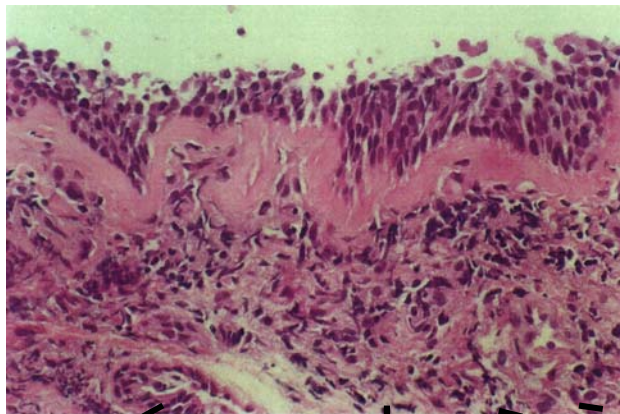
# Matériel : les biopsies



**Transmission des informations  
endoscopiste –  
anatomopathologiste**

**Fixation dans milieu adapté aux  
études ultérieures**

**Possibilité de fixation /  
congélation sur site**



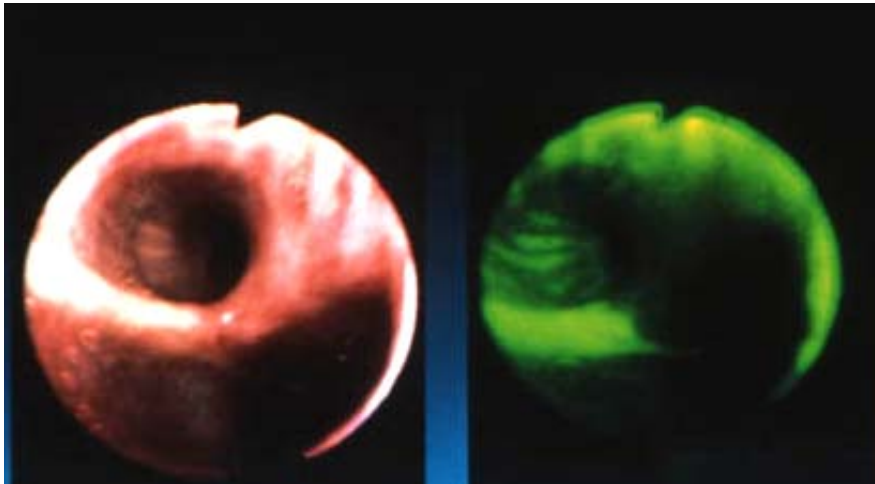
**Analyse  
macroscopique**

**Immuno-  
histochimie**

**Analyse  
ADN/ARN**

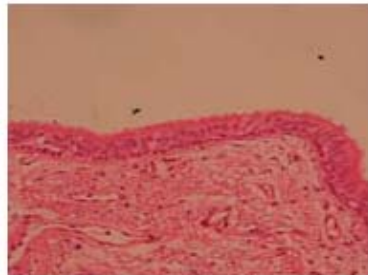
**Analyse  
protéines**

# Matériel : les biopsies



Diagnostic de lésions  
prénéoplasiques ou précoces  
: endoscopie en  
autofluorescence

Normal



Dysplasie  
légère



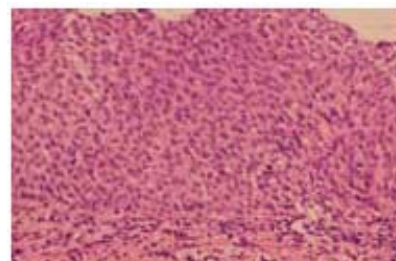
Dysplasie  
modérée



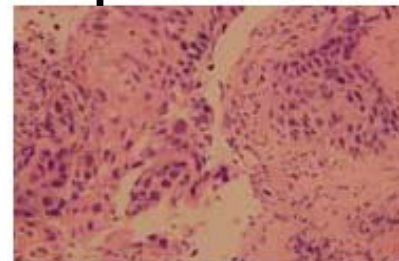
Dysplasie  
sévère



CIS



Epidermoïde



Analyse  
macro

Immuno-  
histochimie

Analyse  
ADN/ARN

Analyse  
protéines



# Matériel : le sang



**Accord du patient**

**Centrifugation et  
conservation à  $-80^{\circ}\text{C}$**

**Sérothèque**

**Cellules K circ**

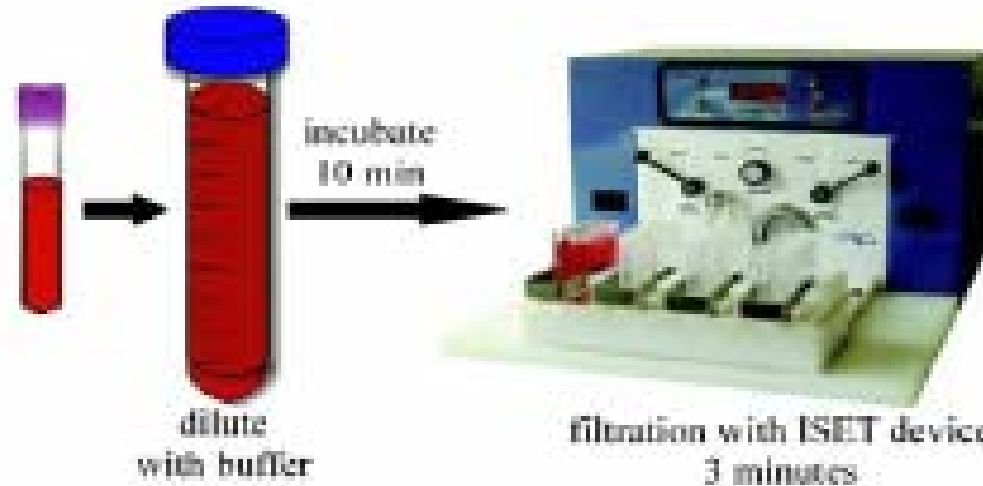
**ADN circulant**

**Protéomique**

**microRNAs**

**méthylation**

# ISET (Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells)



**Analyse  
Quantitative**

**Comptage  
cellulaire**

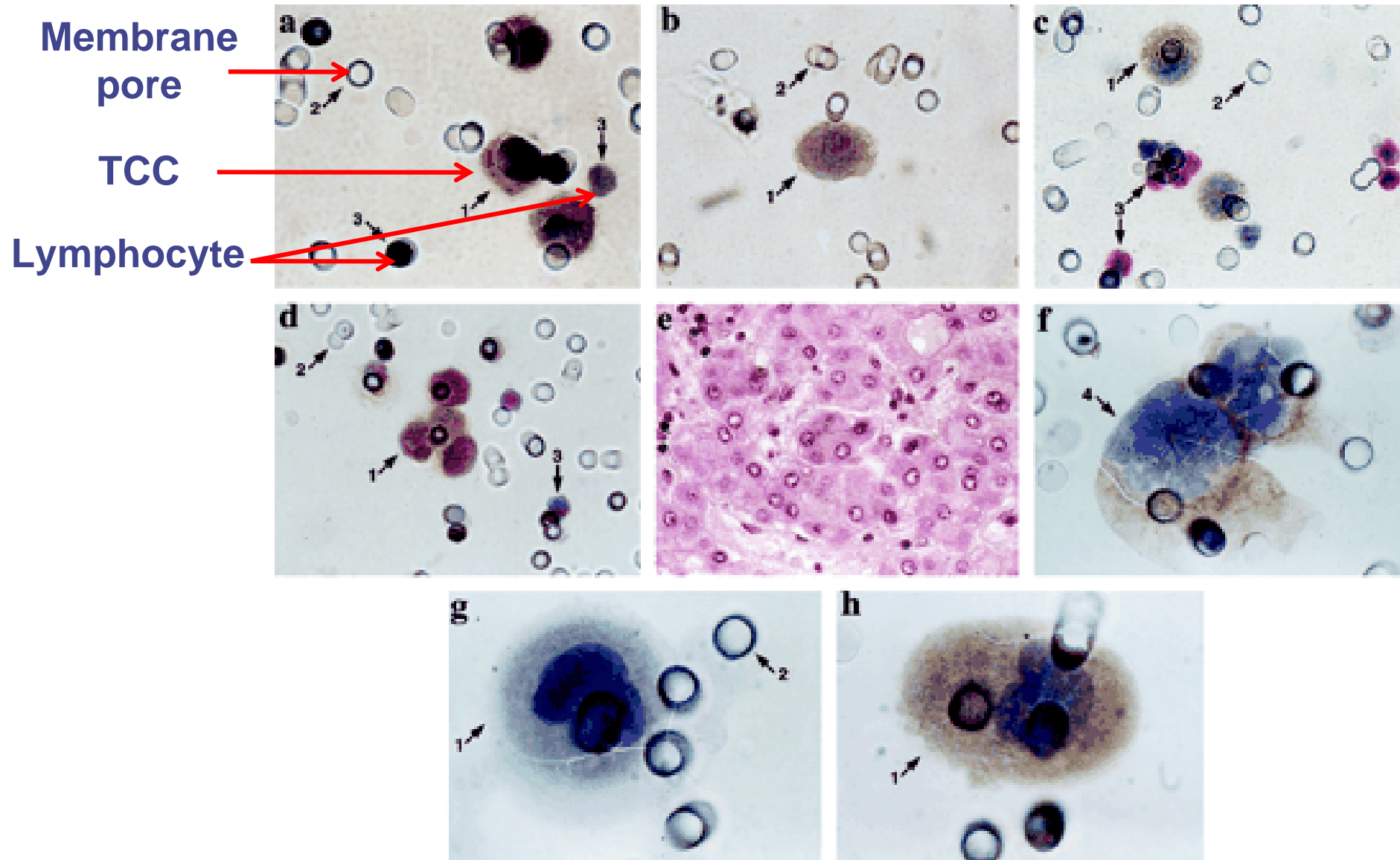
**Analyse  
qualitative**

**Morphologie  
& IHC**

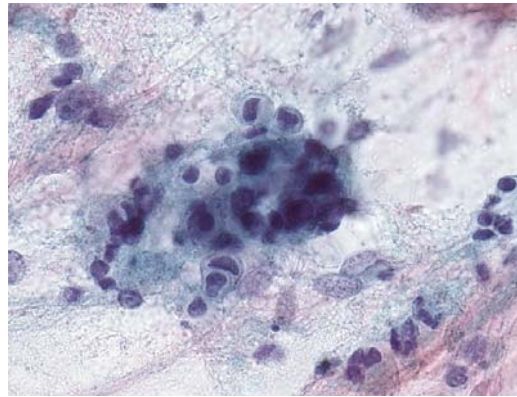
**Analyse  
moléculaire**

**Culture  
cellulaire**

# Immuno-cytochimie post-ISET



# Matériel : expectoration et air exhalé



**Analyse de l'expectoration  
(spontané ou après sérum  
hypertonique)**

**Recueil et centrifugation pour  
analyse cytologique**

**Fixation et extraction**

**Air exhalé : analyse des  
composés volatiles**

**Analyse  
macroscopique**

**Hybridation in  
situ**

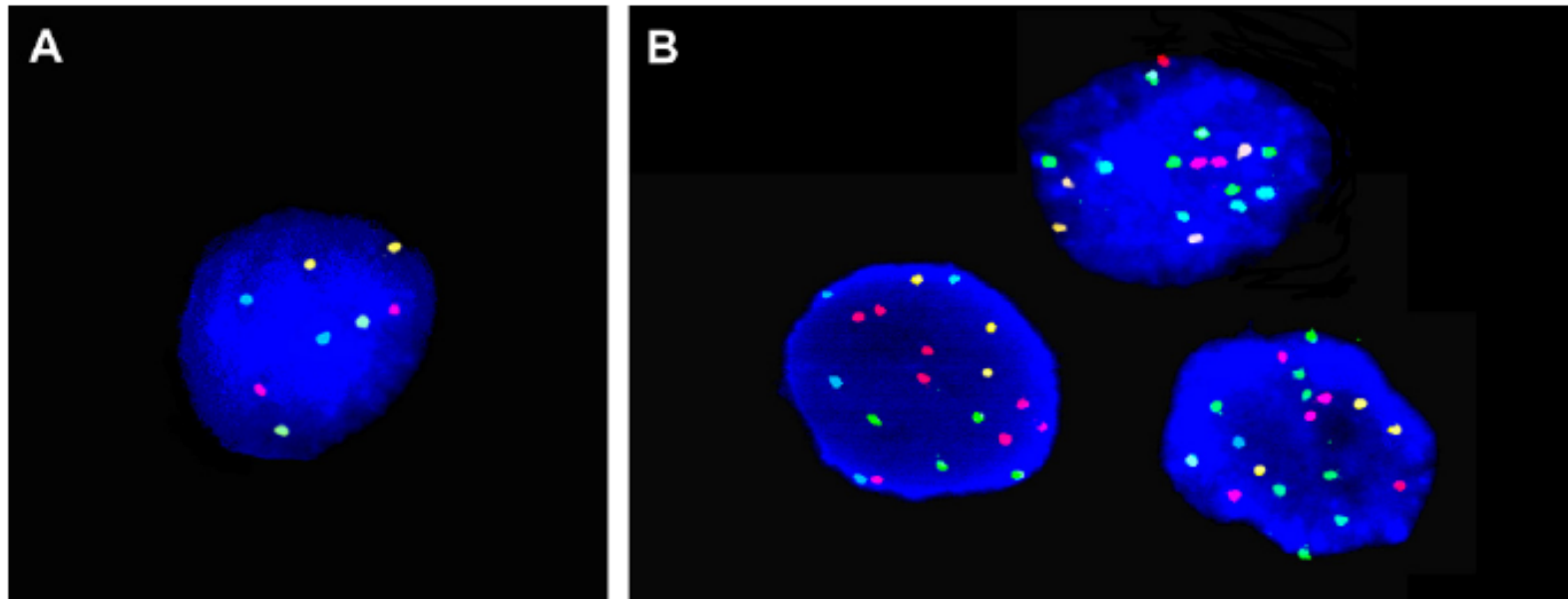
**Analyse  
ADN/ARN**

**Analyse  
protéines**

# Matériel : expectoration et air exhalé

Gain of the EGFR gene located on 7p12 is a frequent and early event in squamous cell carcinoma of the lung

Ji Un Kang<sup>a</sup>, Sun Hoe Koo<sup>a,\*</sup>, Kye Chul Kwon<sup>a</sup>, Jong Woo Park<sup>a</sup>, Sung Su Jung<sup>b</sup>



# Matériel : synthèse

Matériel	Avantages	Inconvénients	Techniques de (semi)-routine	Techniques en évaluation
<b>Pièce opératoire</b>	Analyse macroscopique Matériel important Hétérogénéité de la tumeur représentée	Mélangé à du tissu sain Nécessité d'une congélation rapide	Morphologie Immunohistochimie Séquençage EGFR et K-Ras Tissu Array RT-PCR	Profil d'expression Micropuces ARN et miARN Epigénétique FISH
<b>Biopsies</b>	Accès facile Possibilité de rebiopsies	Matériel non représentatif Petite taille	Morphologie Immunohistochimie Séquençage EGFR et K-Ras RT-PCR	Profils d'expression Tissu Array FISH
<b>Sputum</b>	Accès facile Non invasif	Technique en Évaluation	Immunocytochimie	Séquençage FISH
<b>Sang/sérum</b>	Accès facile et itératif Mise en évidence de lésions acquises	Anomalies non spécifiques du poumon	Analyse des polymorphismes Analyse de l'ADN tumoral circulant	Analyse des cellules tumorales circulantes

# La biologie..en pratique

## Matériel

Tumeur

Biopsie

Sang

Sputum

Air exhalé

## Analyse

ADN

ARNm

microARN

épigénétique

Protéines

## Utilisation

dépistage

diagnostic

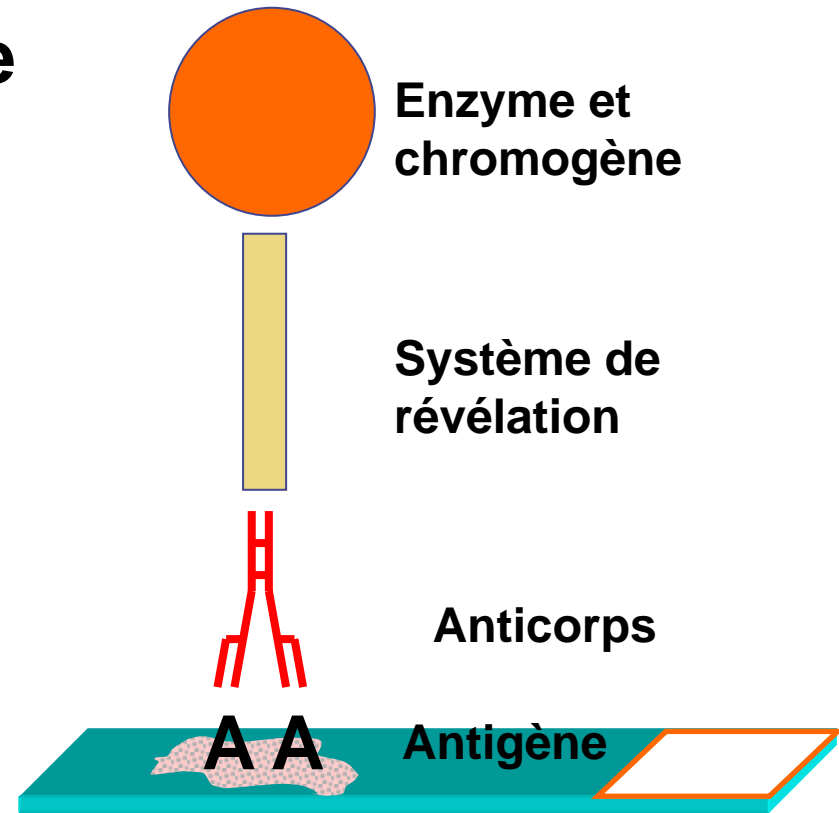
pronostic

prédictif

traitement

# Technique : immunohistochimie

- **révélation chromogénique**
- **amplification**
- **affinité de l'anticorps**
- **démasquage antigénique**  
MO, enzymes, chaleur

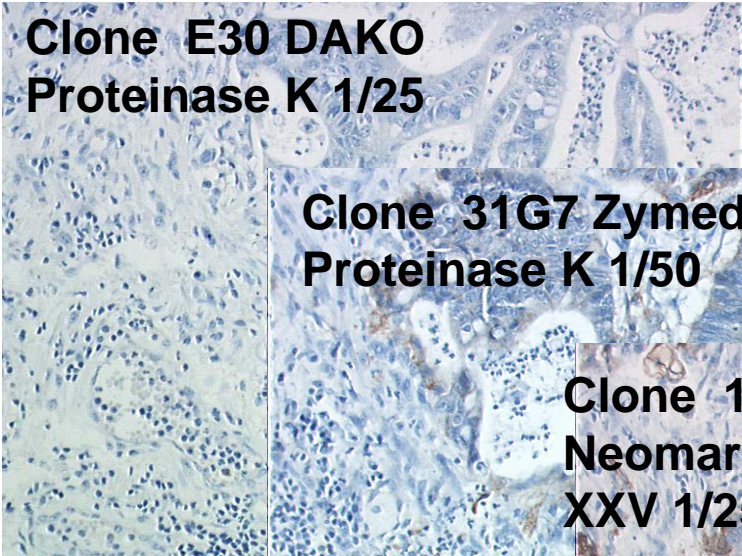


**+++ démasquage et anticorps**

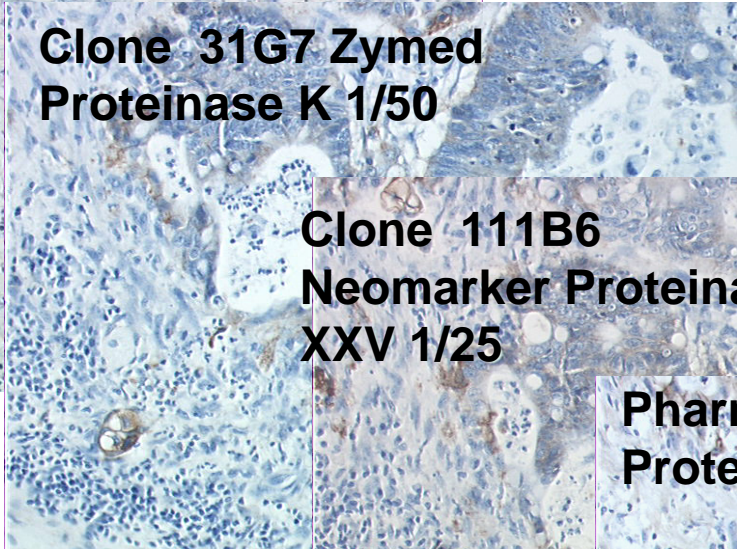


# Immunohistochimie EGFR

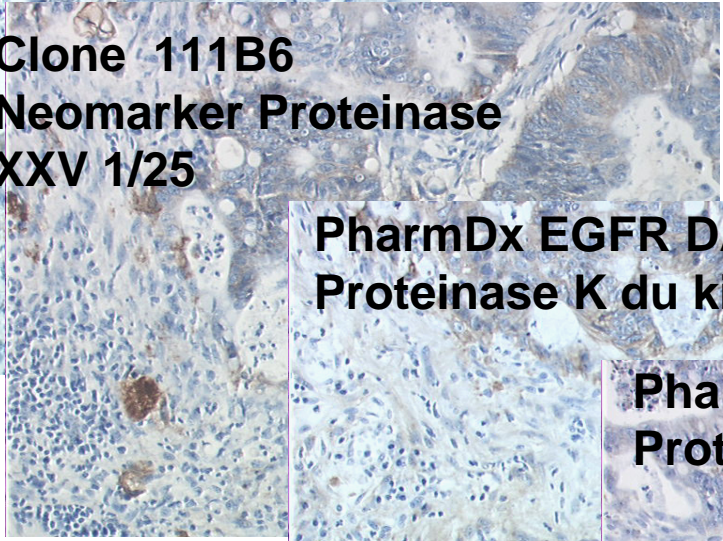
**Clone E30 DAKO**  
**Proteinase K 1/25**



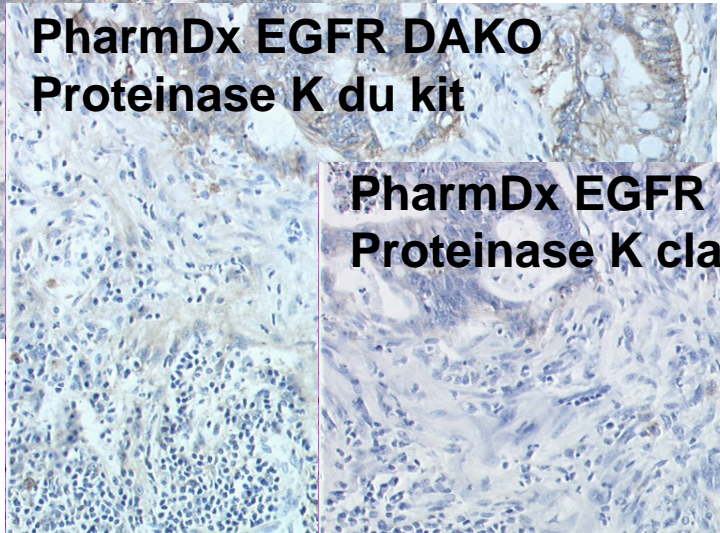
**Clone 31G7 Zymed**  
**Proteinase K 1/50**



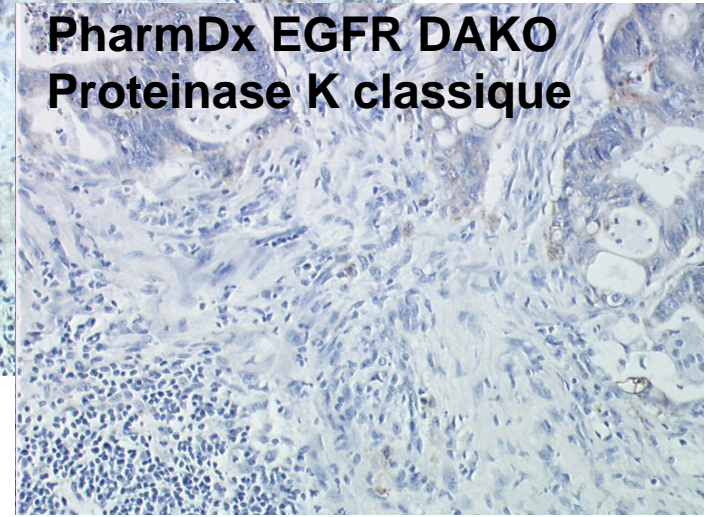
**Clone 111B6**  
**Neomarker Proteinase**  
**XXV 1/25**



**PharmDx EGFR DAKO**  
**Proteinase K du kit**

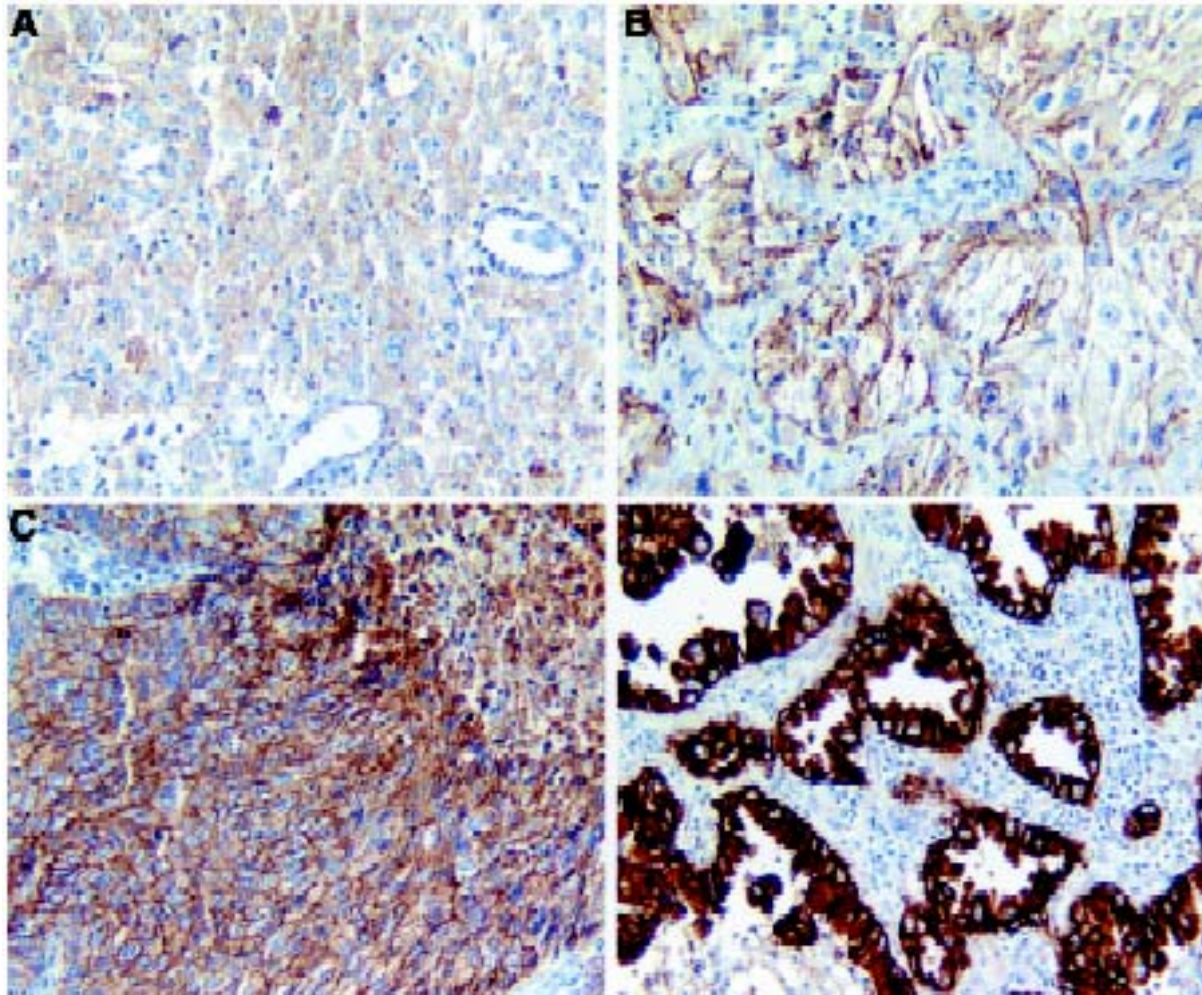


**PharmDx EGFR DAKO**  
**Proteinase K classique**

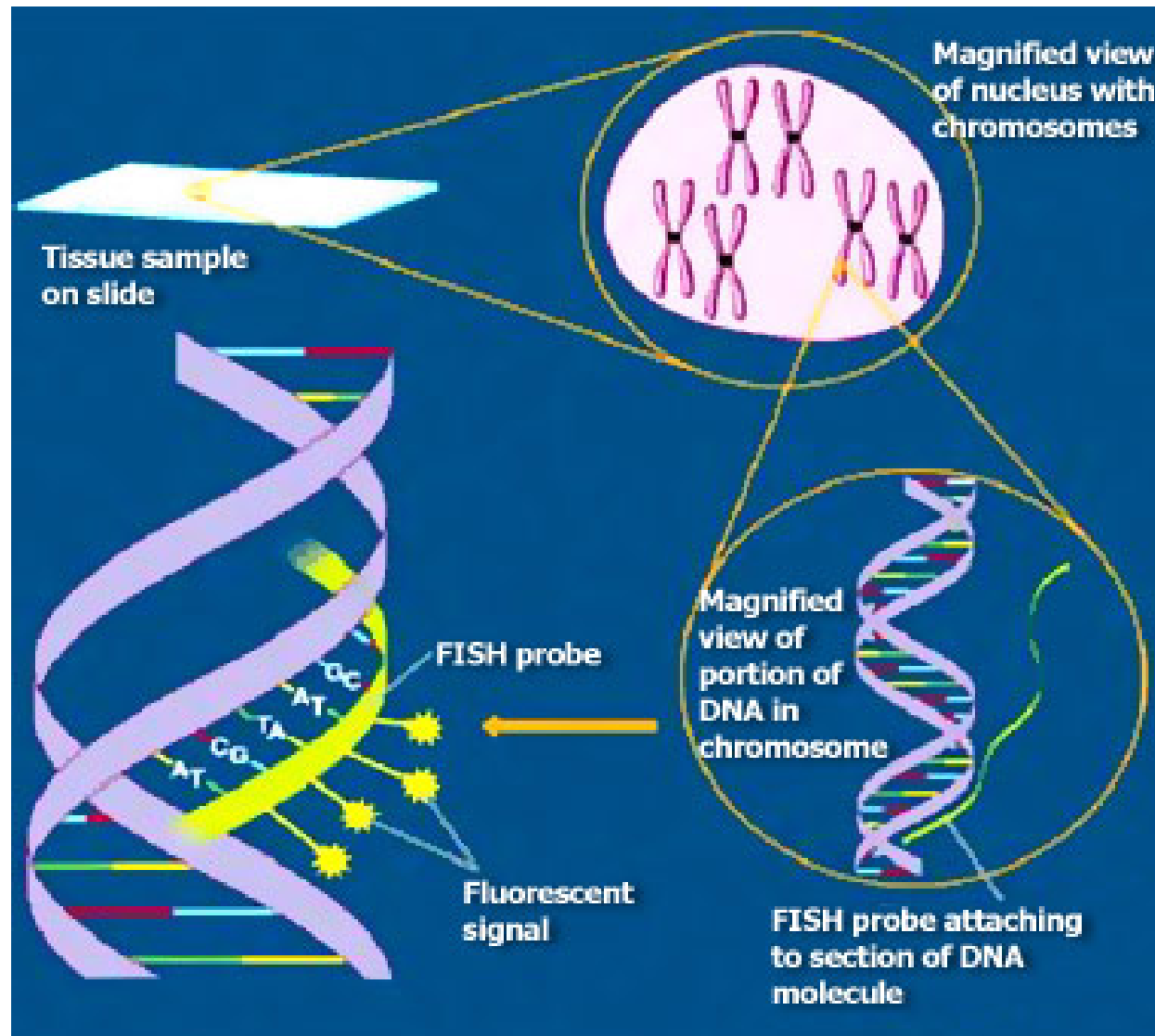




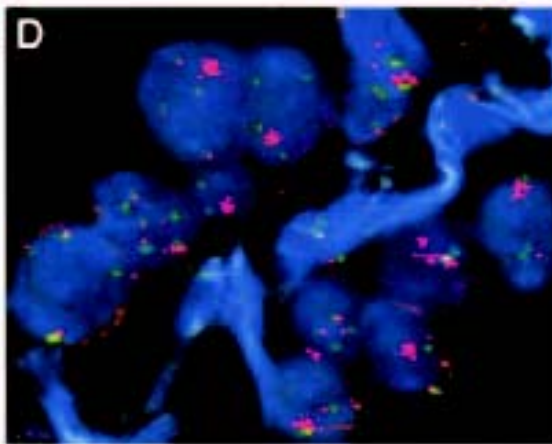
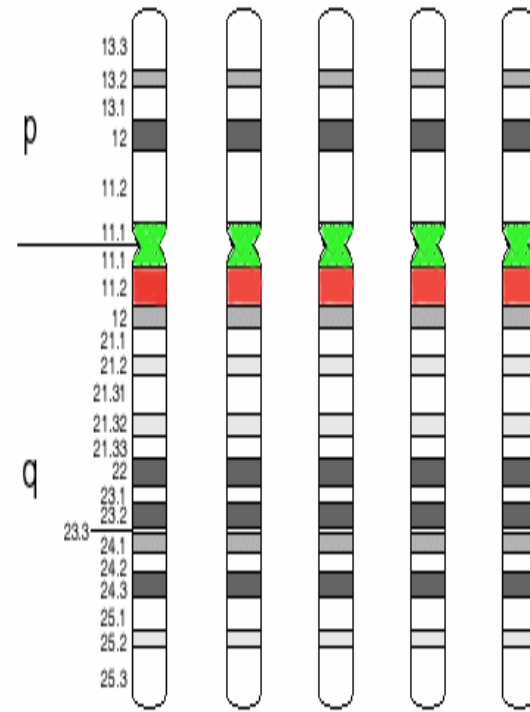
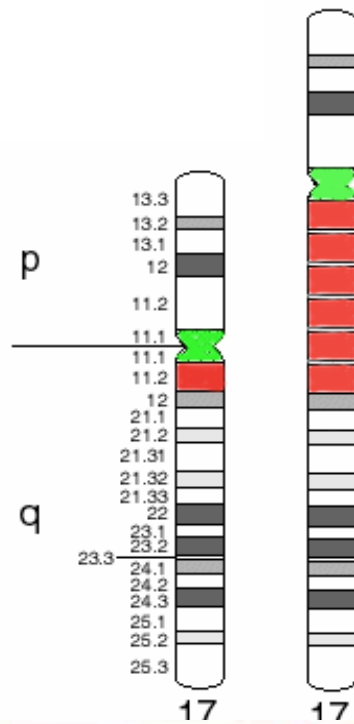
# Immunohistochimie EGFR : densité



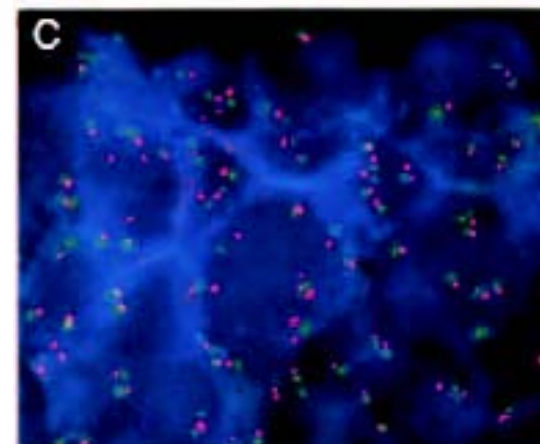
# Technique : Hybridation in situ



# Marqueurs moléculaires : FISH EGFR

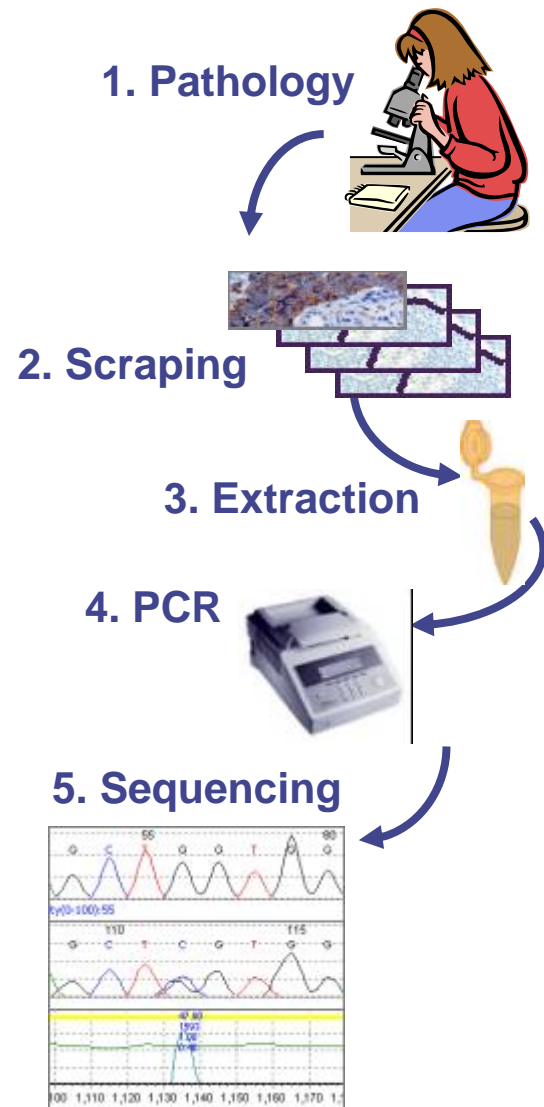


Amplification génique



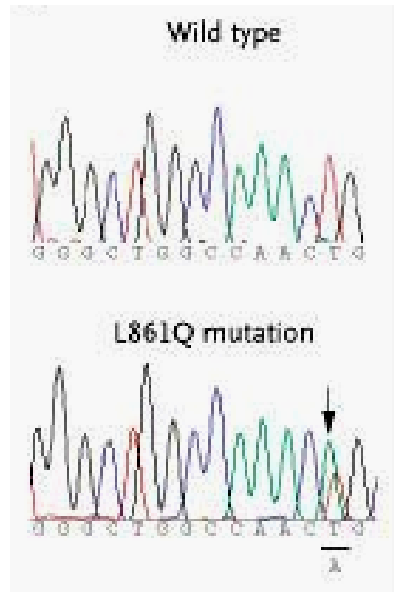
Polyploïdie

# Séquençage EGFR

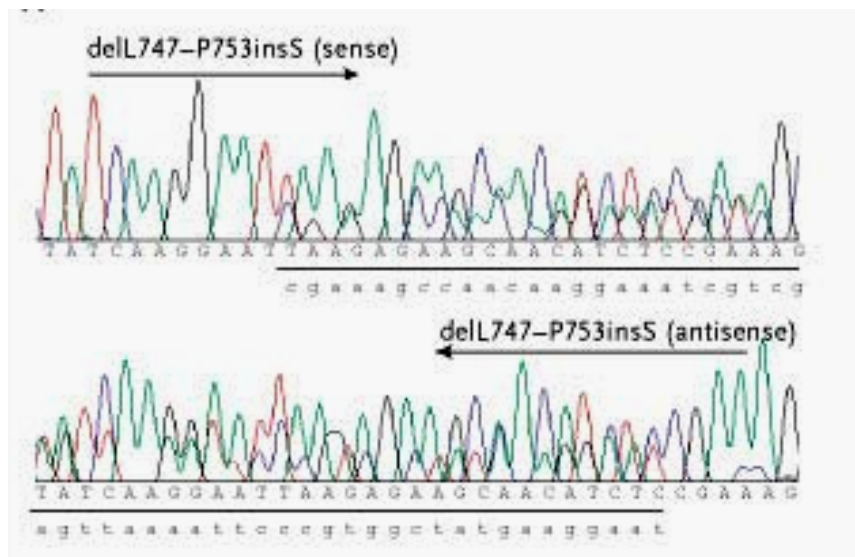
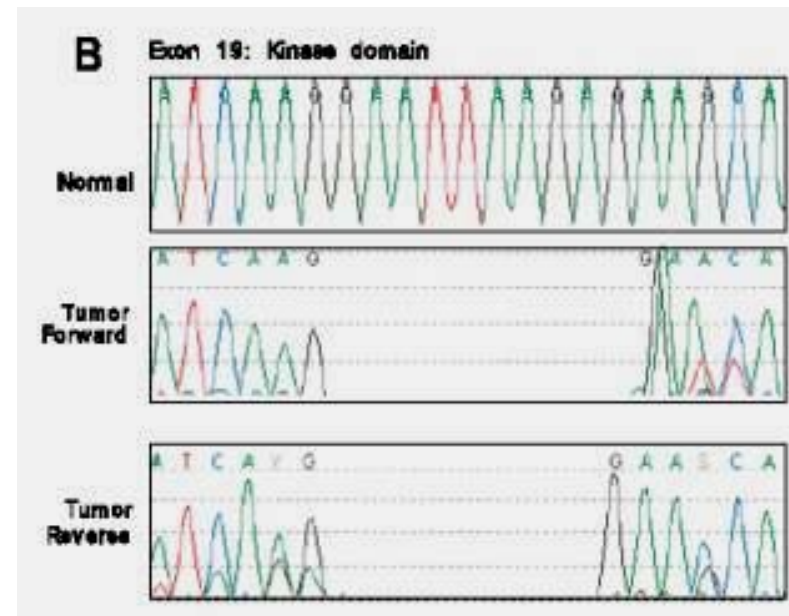


# Séquençage EGFR

**Mutation ponctuelle**



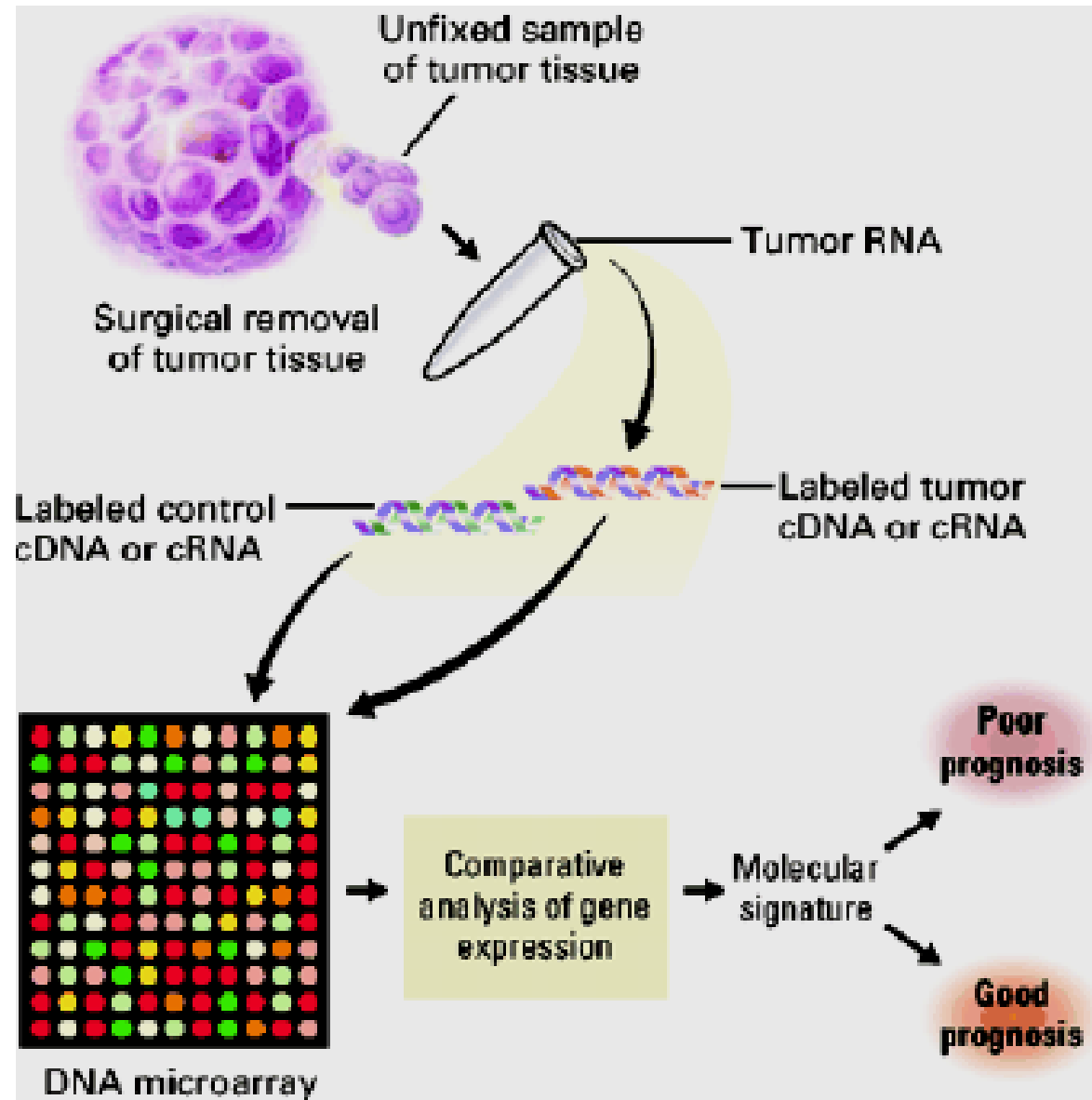
**Délétion**



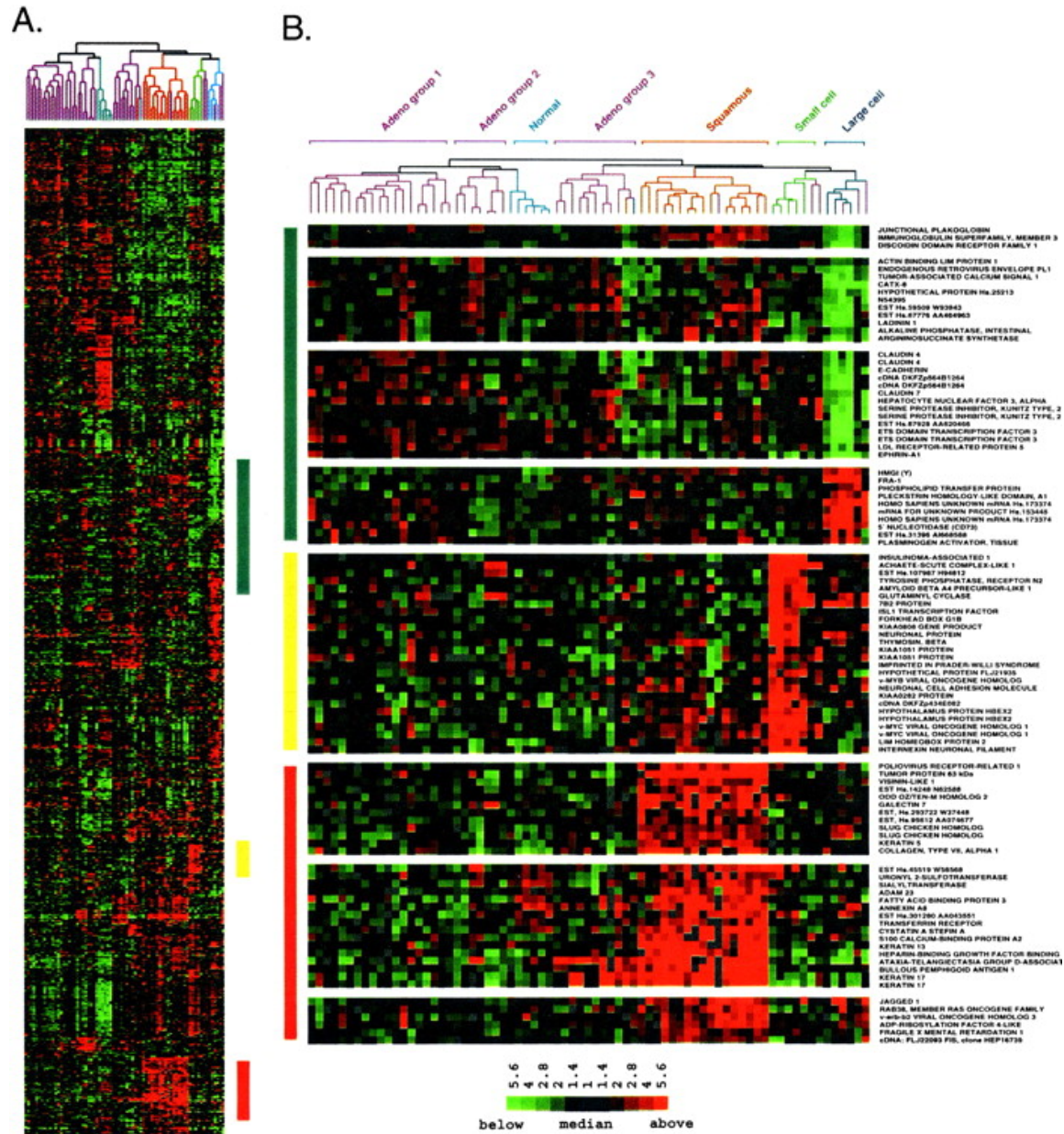
**Mutation antisens**



# Micropuces

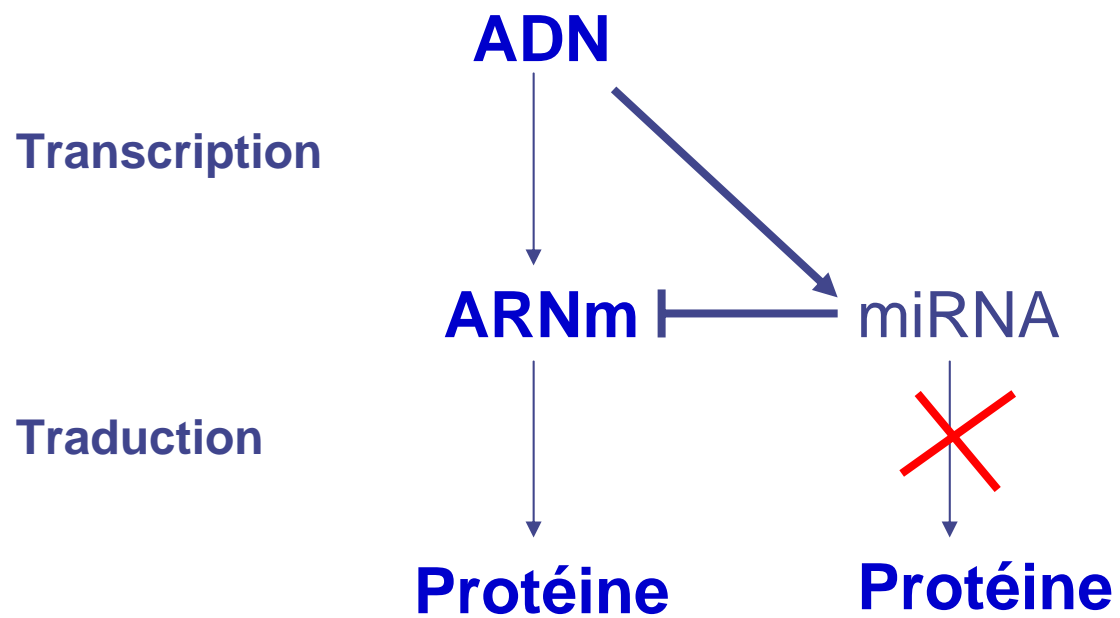


# Micropuces : classification des tumeurs

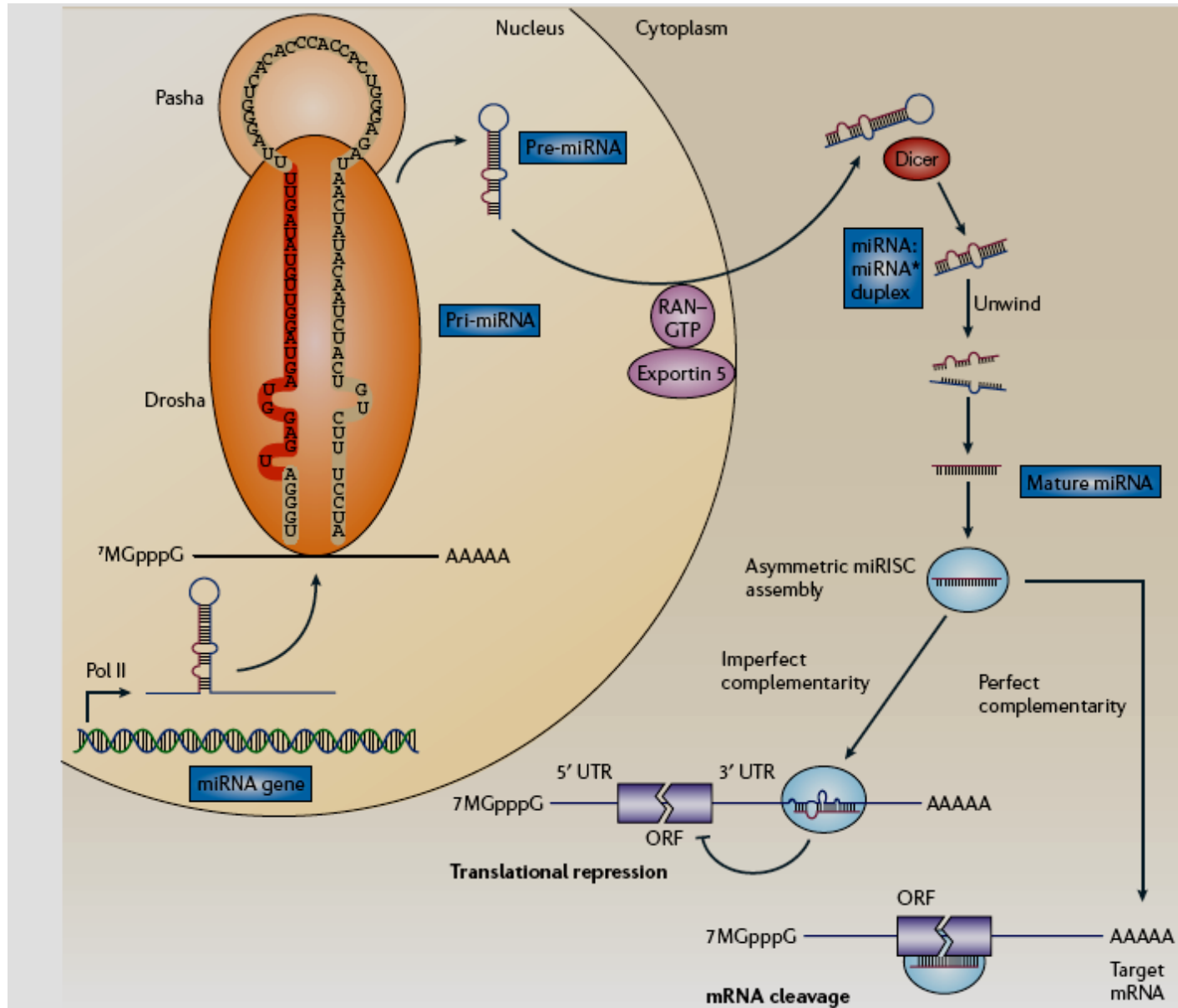




# Technique : miRNA



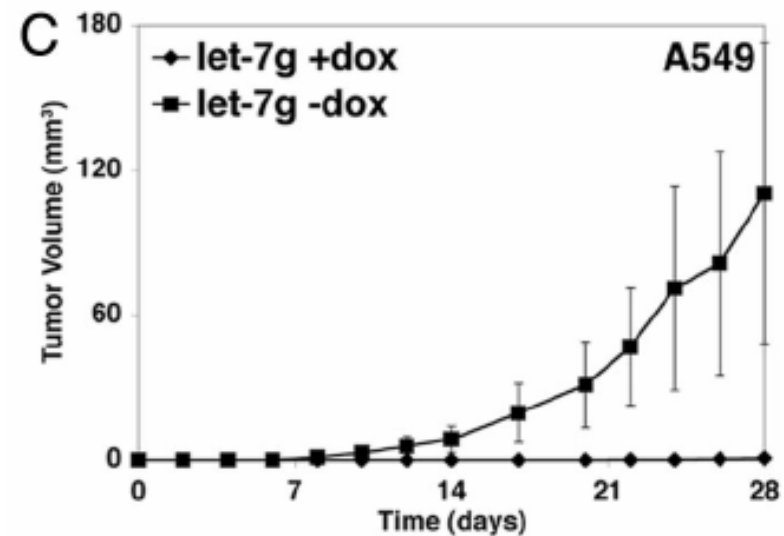
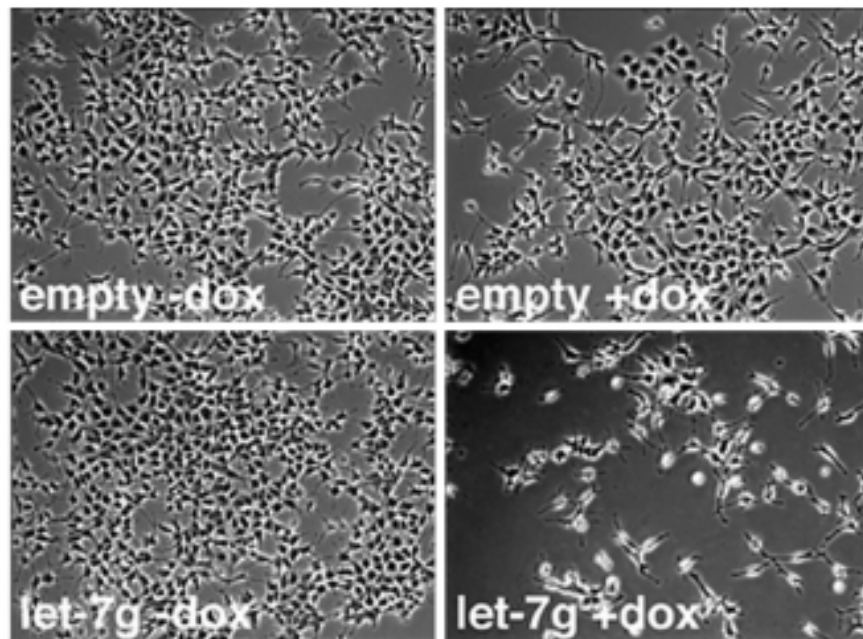
# Technique : microRNAs



# miRNAS et poumon

## Suppression of non-small cell lung tumor development by the *let-7* microRNA family

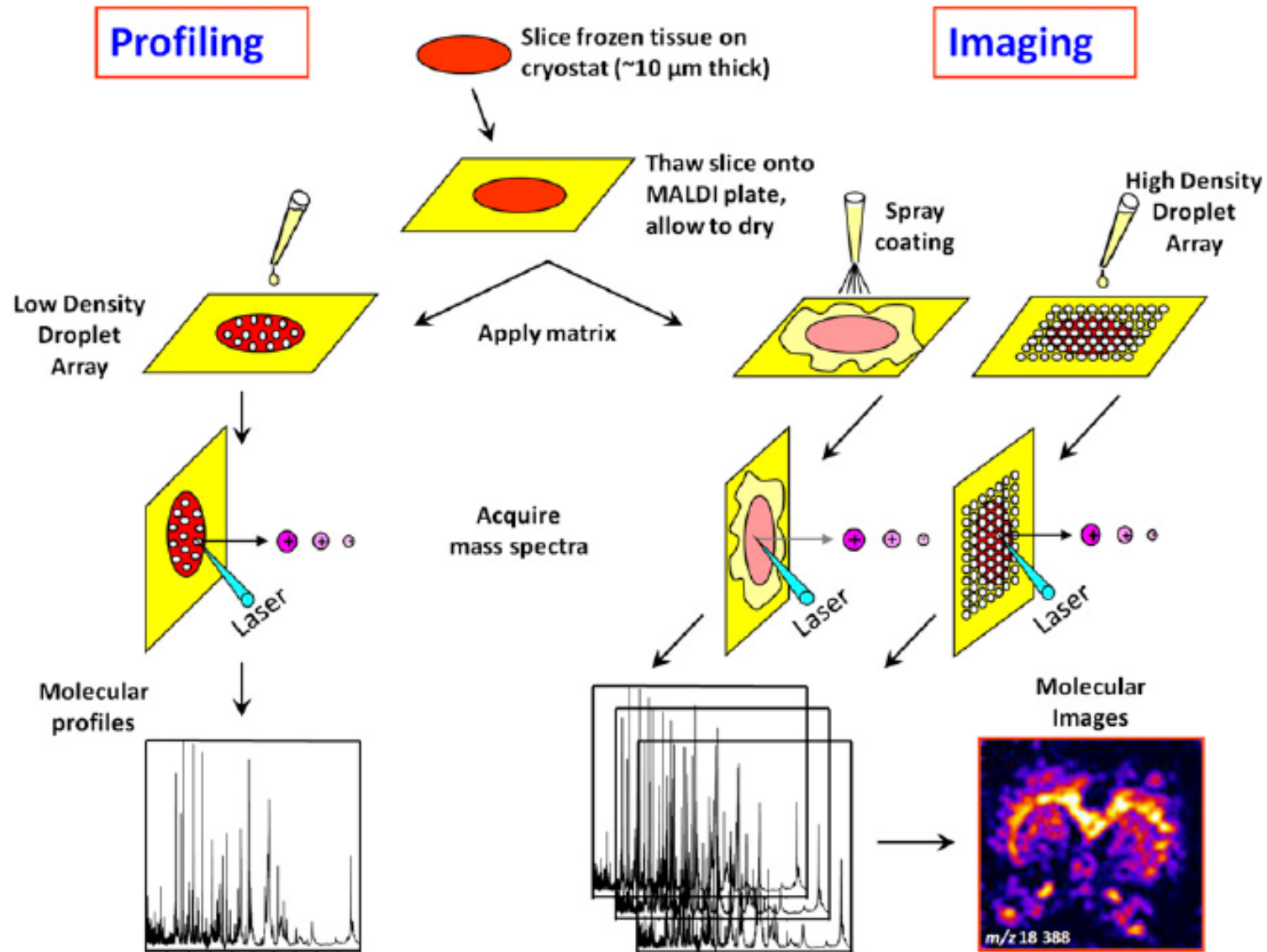
Madhu S. Kumar\*, Stefan J. Erkeland†, Ryan E. Pester\*, Cindy Y. Chen\*, Margaret S. Ebert\*, Phillip A. Sharp\*\*‡, and Tyler Jacks\*\*§



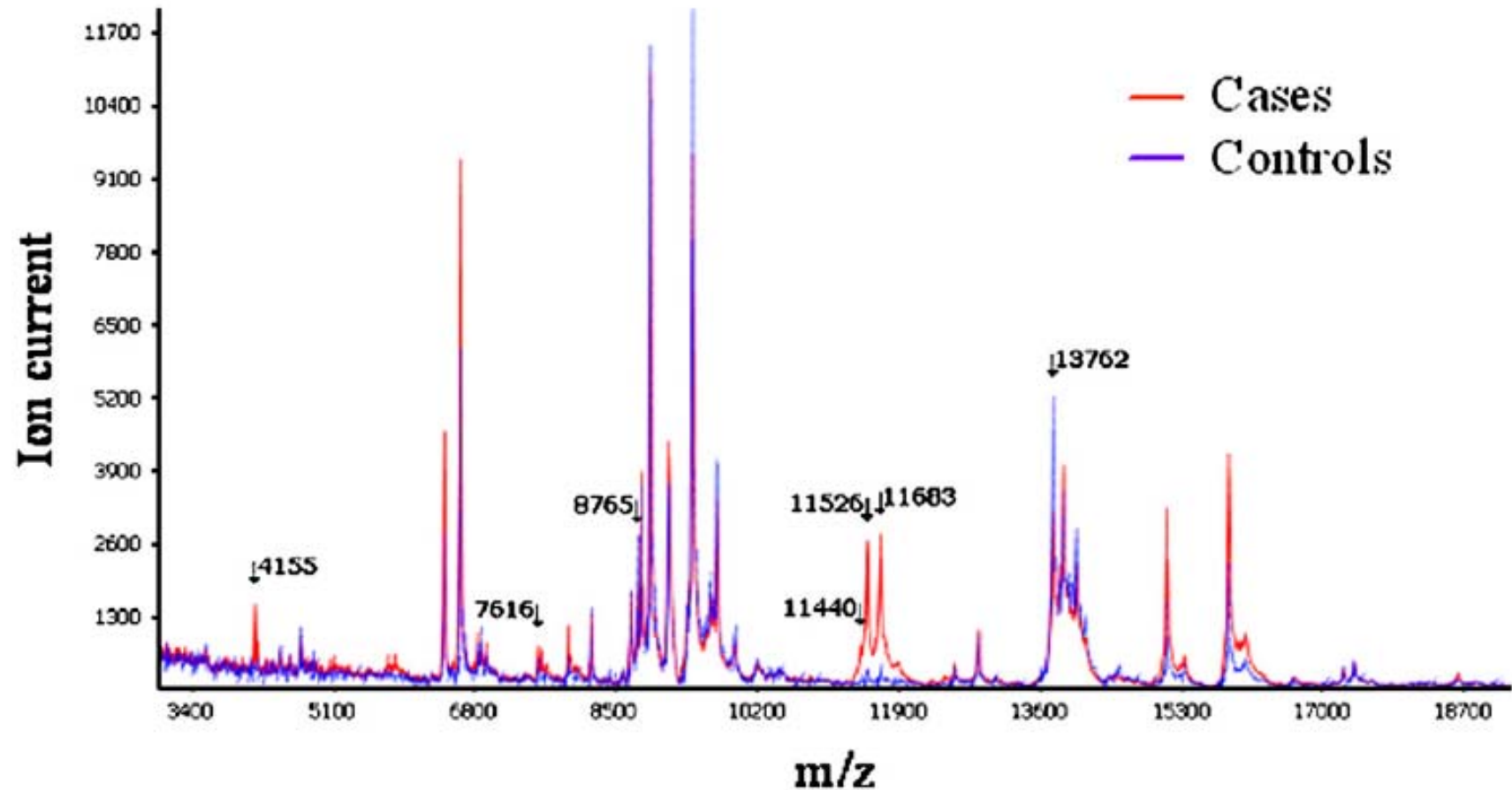
# Technique : protéomique



# Technique : protéomique



# Technique : protéomique



Analyse du spectre de protéines cancer vs contrôle  
Technique de spectrométrie de masse (MALDI-MS)

# La biologie..en pratique

## Matériel

Tumeur

Biopsie

Sang

Sputum

Air exhalé

## Analyse

ADN

ARNm

microARN

épigénétique

Protéines

## Utilisation

dépistage

diagnostic

pronostic

prédictif

traitement

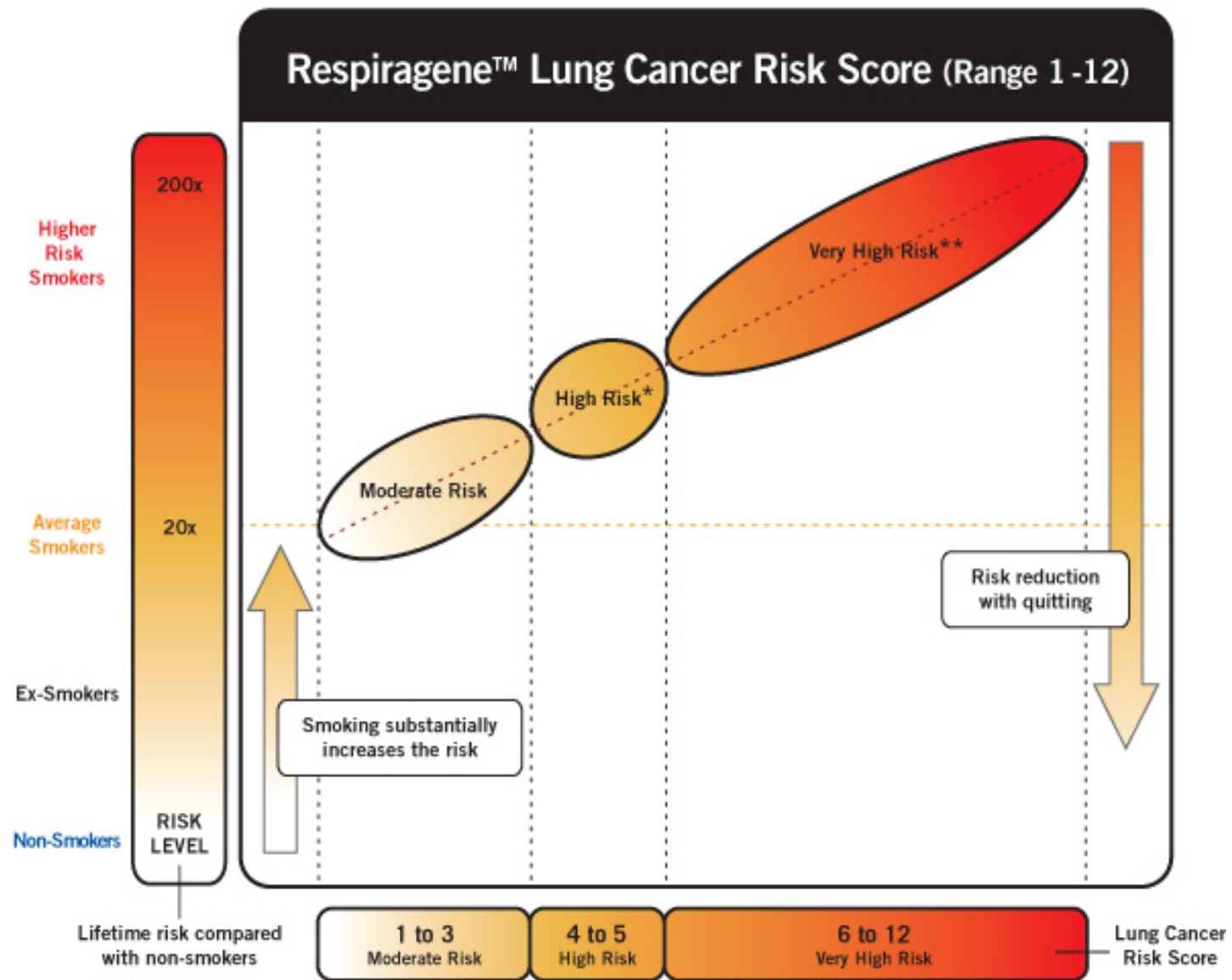


# Dépistage : Test Respiragene\*

- **Nouvelle-Zélande, Pr Young, Synergens Biosciences**
- **Prélèvement buccal (bâtonnet)**
- **Sur population à risque (fumeurs)**
- **N = 439 (200 contrôles; 239 KBP)**
- **Classification en 3 catégories de risque.**
- **Analyse de 20 SNP (polymorphisme mononucléotidique)**
- **Objectif : sevrage tabagique et dépistage**
- **Commercialisation : 2009 (NZ) et 2010**



# Dépistage : Test Respiragene\*



\* High Risk = 4 x the Average Smokers' Risk

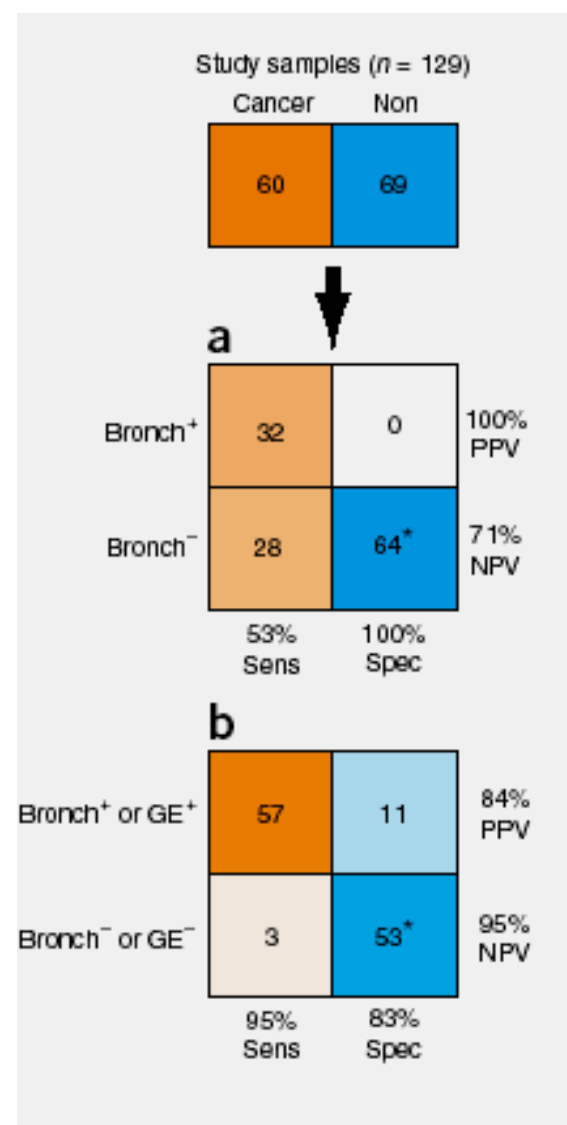
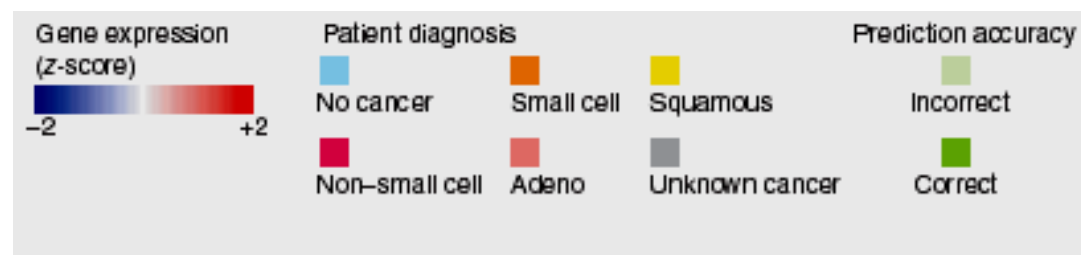
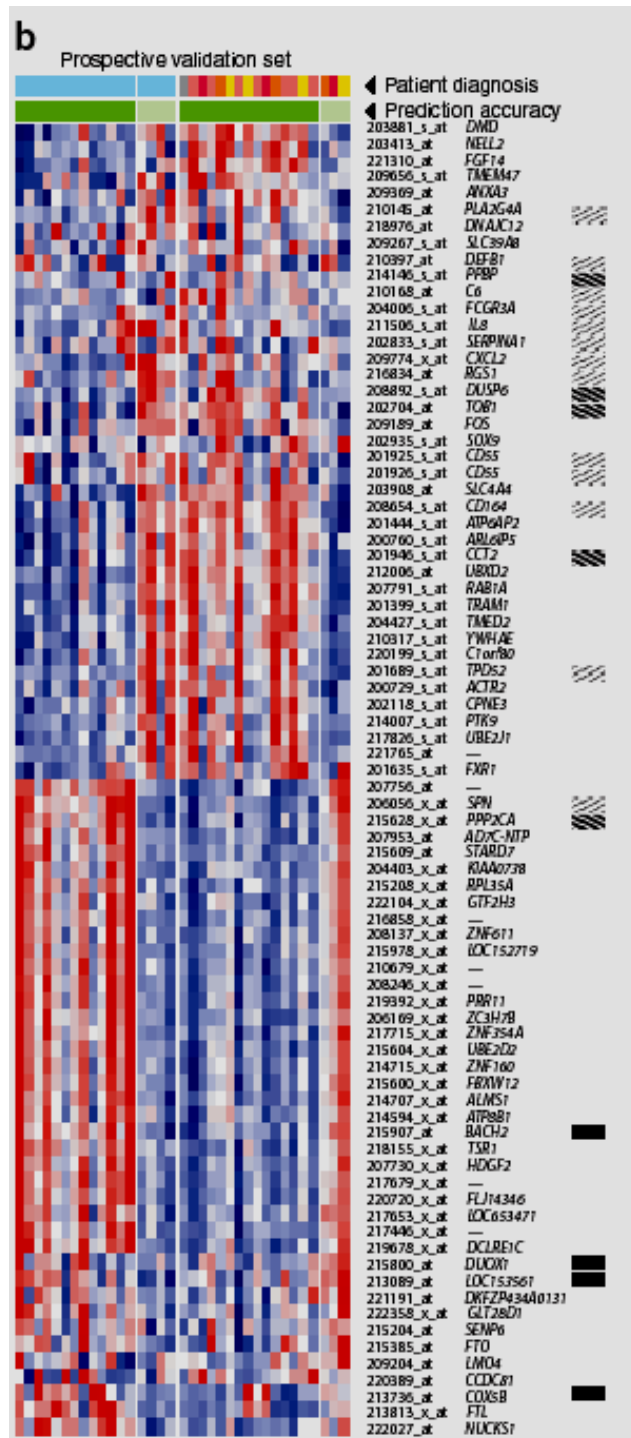
\*\* Very High Risk = 10 x the Average Smokers' Risk

# Dépistage : micropuces

Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer

Avrum Spira<sup>1</sup>, Jennifer E Beane<sup>2,8</sup>, Vishal Shah<sup>2,8</sup>, Katrina Steiling<sup>1</sup>, Gang Liu<sup>1</sup>, Frank Schembri<sup>1</sup>, Sean Gilman<sup>3</sup>, Yves-Martine Dumas<sup>1</sup>, Paul Calner<sup>4</sup>, Paola Sebastiani<sup>5</sup>, Sriram Sridhar<sup>1</sup>, John Beamis<sup>3</sup>, Carla Lamb<sup>3</sup>, Timothy Anderson<sup>6</sup>, Norman Gerry<sup>7</sup>, Joseph Keane<sup>4</sup>, Marc E Lenburg<sup>7</sup> & Jerome S Brody<sup>1</sup>

- **USA**
- **Endoscopie + biopsie**
- **n = 119**
- **Analyse pan-génomiques (22 215 gènes) par puce Affymetrix**
- **Sélection de 80 gènes (# fumeurs avec ou sans cancer)**
- **Association analyse anatomo-pathologique + test = VPN 95% et Sensibilité 95%**



# Dépistage : Méthylation (sputum)

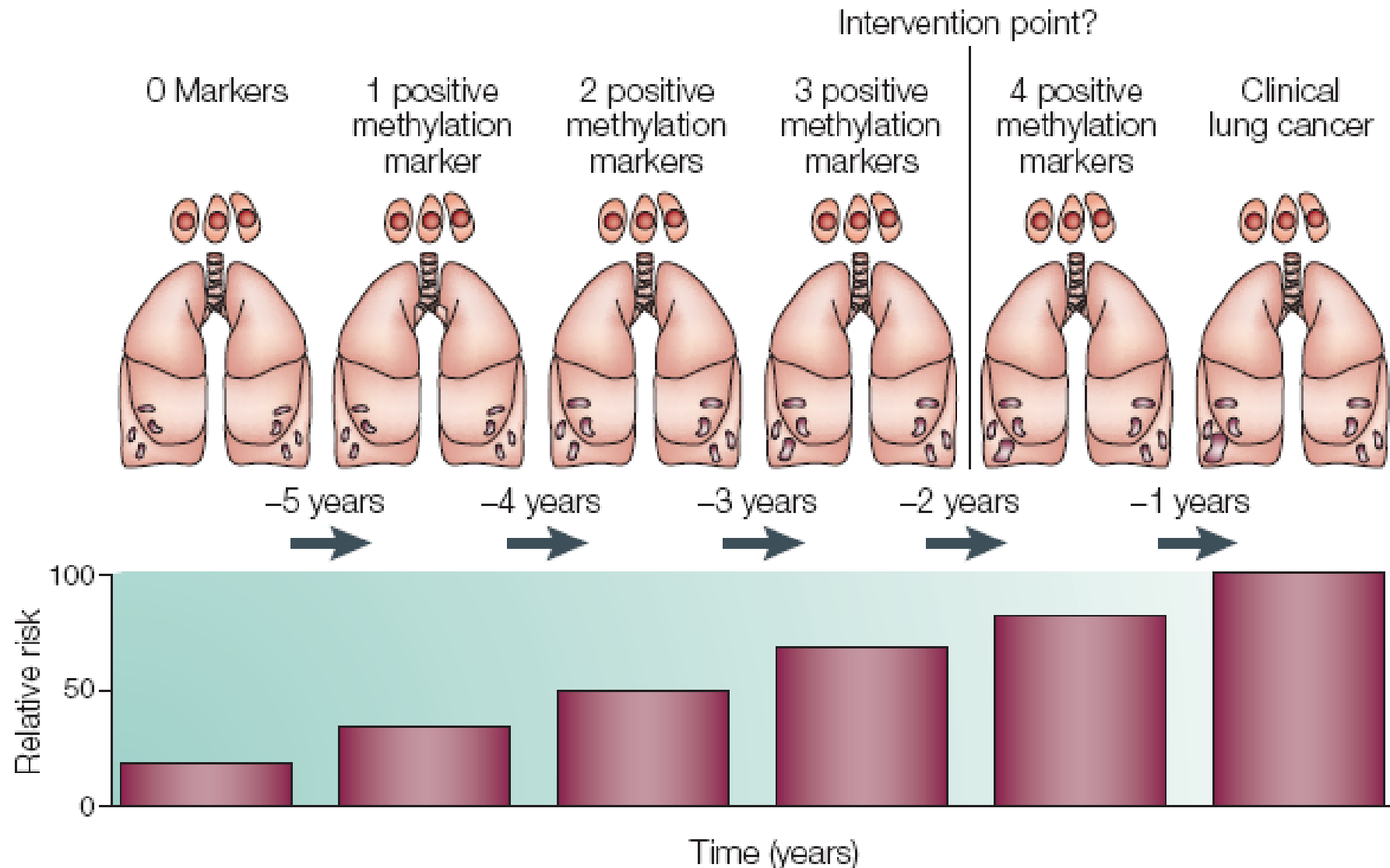
## GENE-PROMOTER HYPERMETHYLATION AS A BIOMARKER IN LUNG CANCER

Steven A. Belinsky

Table 3 | **Methylated genes in sputum from people at risk of lung cancer**

Sample Size	Markers	Assay	Prevalence	References
123	<i>CDKN2A</i> <i>MGMT</i>	NMSP	15% 25%	115
66	<i>CDKN2A</i> <i>MGMT</i> <i>DAPK</i> <i>RASSF1A</i>	NMSP	35% 14% 24% 3%	98
25	<i>CDKN2A</i>	HNMSP	28%	116
100	<i>CDKN2A</i>	NMSP	4%	117
73	<i>CDKN2A</i> <i>RASSF1A</i> H-cadherin <i>RARβ2</i>	MSP	5% 4% 10% 27%	118
15	<i>RASSF1A</i>	MSP	33%	119

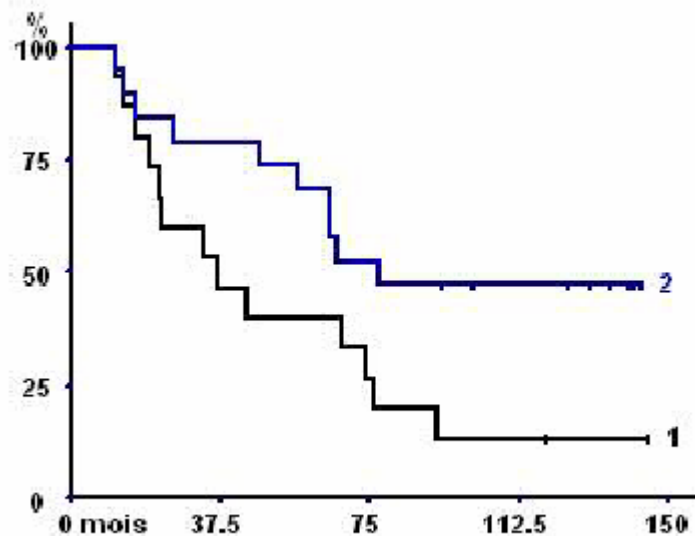
# Dépistage : Méthylation (sputum)



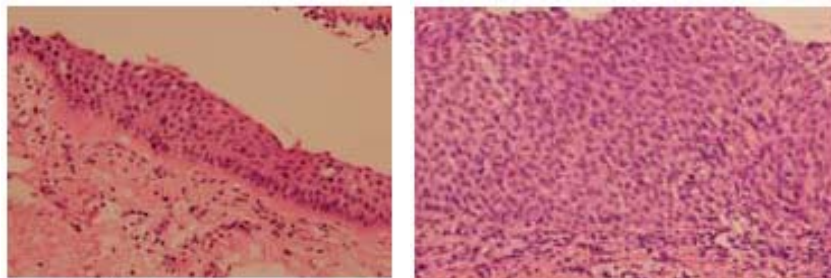
# Diagnostic précoce

## Molecular Predictive Factors for Progression of High-Grade Preinvasive Bronchial Lesions

Mathieu Salaün<sup>1</sup>, Richard Sesboué<sup>2</sup>, Sophie Moreno-Swirc<sup>3</sup>, Josette Metayer<sup>3</sup>, Suzanna Bota<sup>1</sup>, Jeannette Bourguignon<sup>2</sup>, and Luc Thiberville<sup>1</sup>



Survival according to 3p LOH ( $p < 0.04$ , Log Rank)



Analyse des pertes  
d'hétérozygotie sur biopsies  
(après microdissection)

N = 37 (54 lésions)

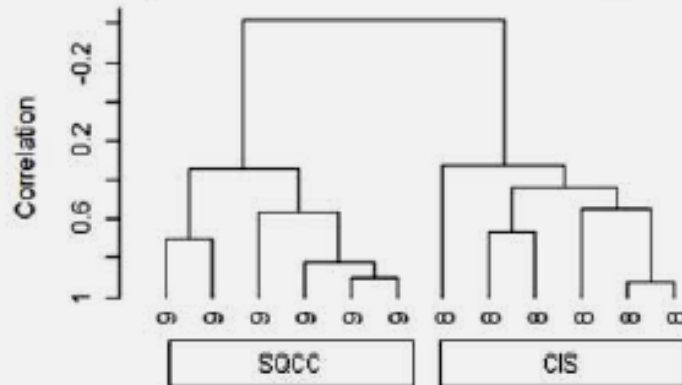
3p LOH est associé à une  
progression des lésions pré-  
néoplasiques

Surveillance accrue ?

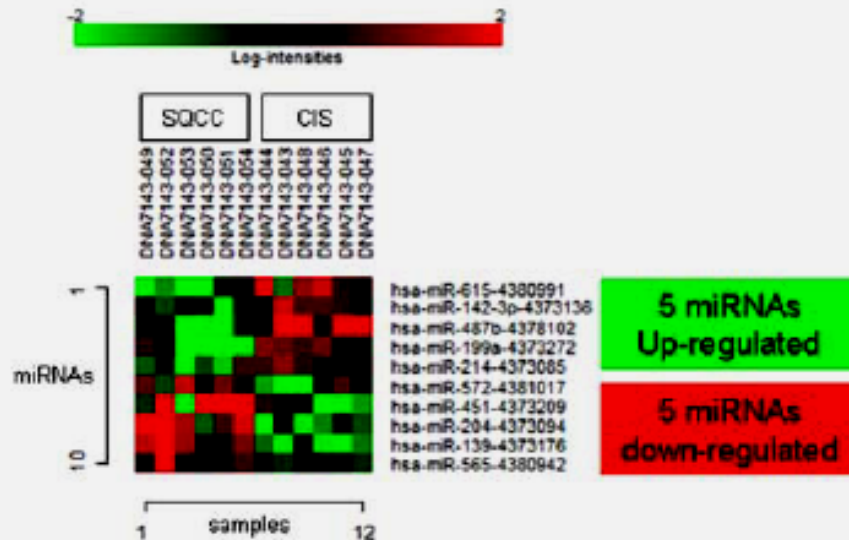
# Diagnostic précoce

Evolution of microRNAs expression during human bronchial squamous carcinogenesis.

**A** Dendrogram for clustering experiments, using centered correlation and average linkage.



**B**



Analyse de l'expression de miRNA sur des biopsies bronchiques (RT-PCR)

N = 60 biopsies

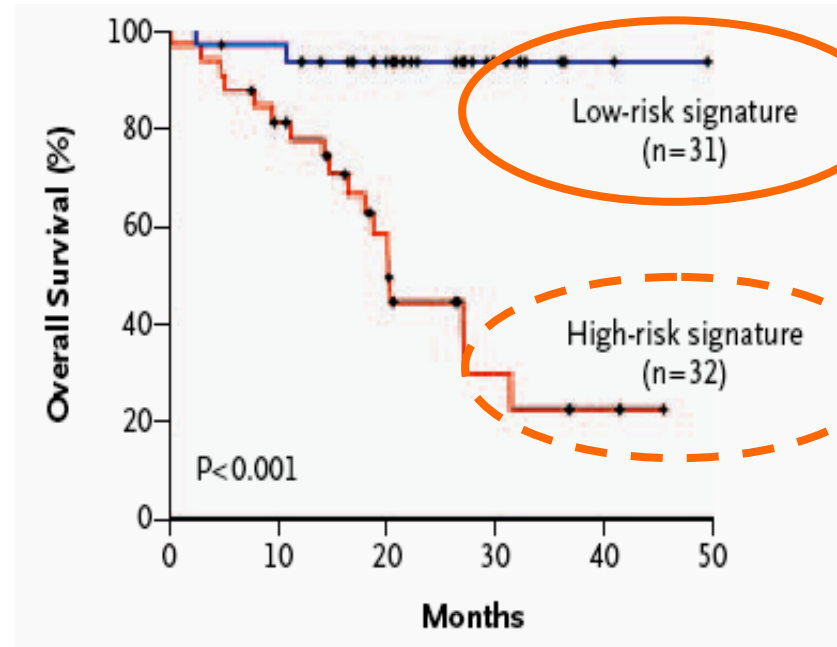
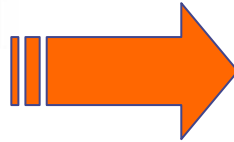
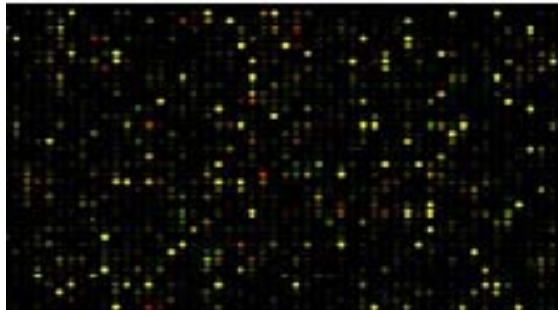
Évolution en 2 étapes (diminution et augmentation)

Séparation CIS et épidermoïdes



# Facteurs pronostic : Micropuces

DNA microarray



Gene

- ERBB3
- LCK
- DUSP6
- STAT1
- MMD
- CPEB4
- RNF4
- STAT2
- NF1
- TRAP1
- DLG2
- IRF4
- ANXA5
- HMMR
- HGF
- ZNF264

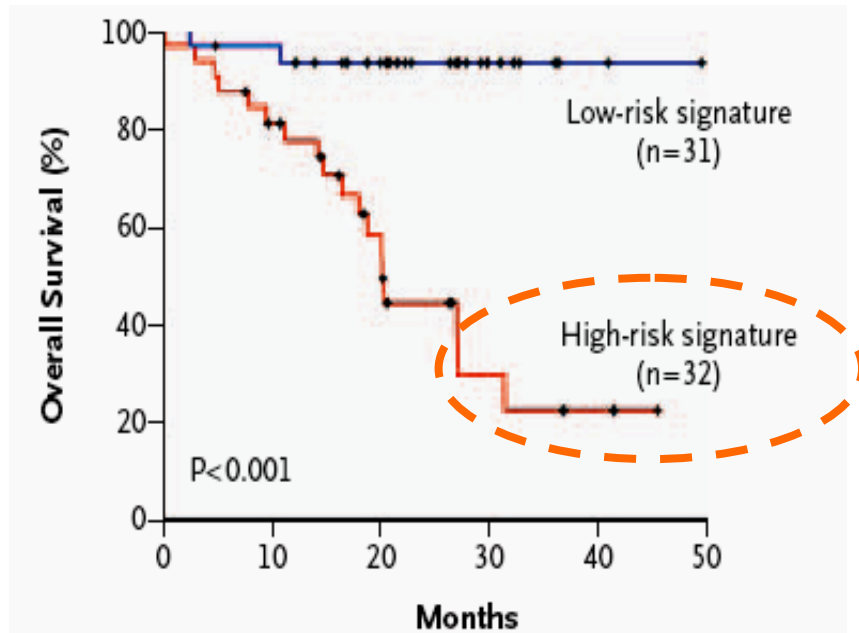
The 16-Gene Signature and Survival of 125 Patients with NSCLC.

Chen HS, NEJM Jan 2007



# Micropuces

## Stades I



The 16-Gene Signature and Survival of 125 Patients with NSCLC.

R

Surveillance

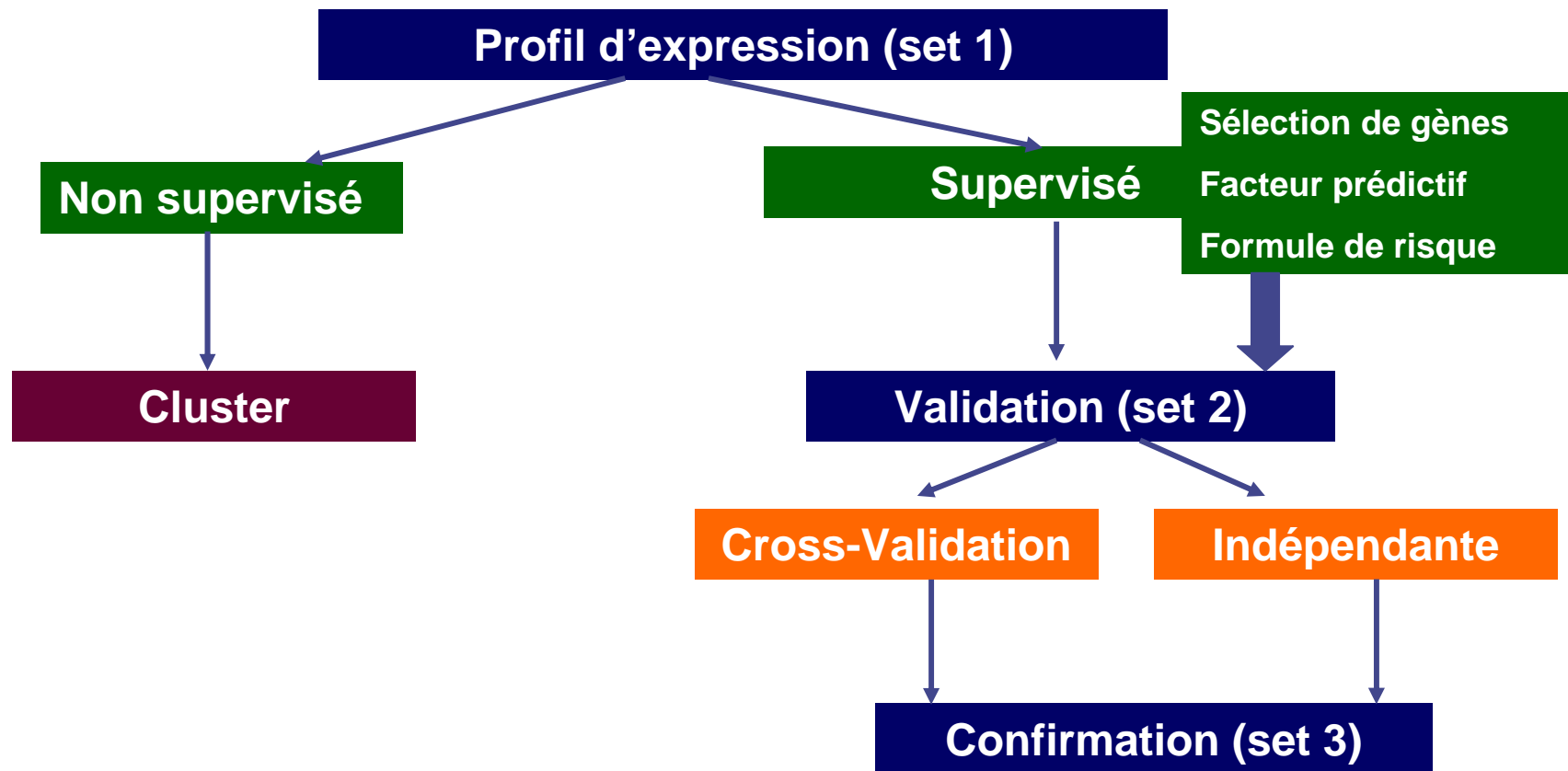
Chimio adjuvante

# Les règles pour les micropuces diagnostiques et pronostiques

## Pitfalls in the Use of DNA Microarray Data for Diagnostic and Prognostic Classification

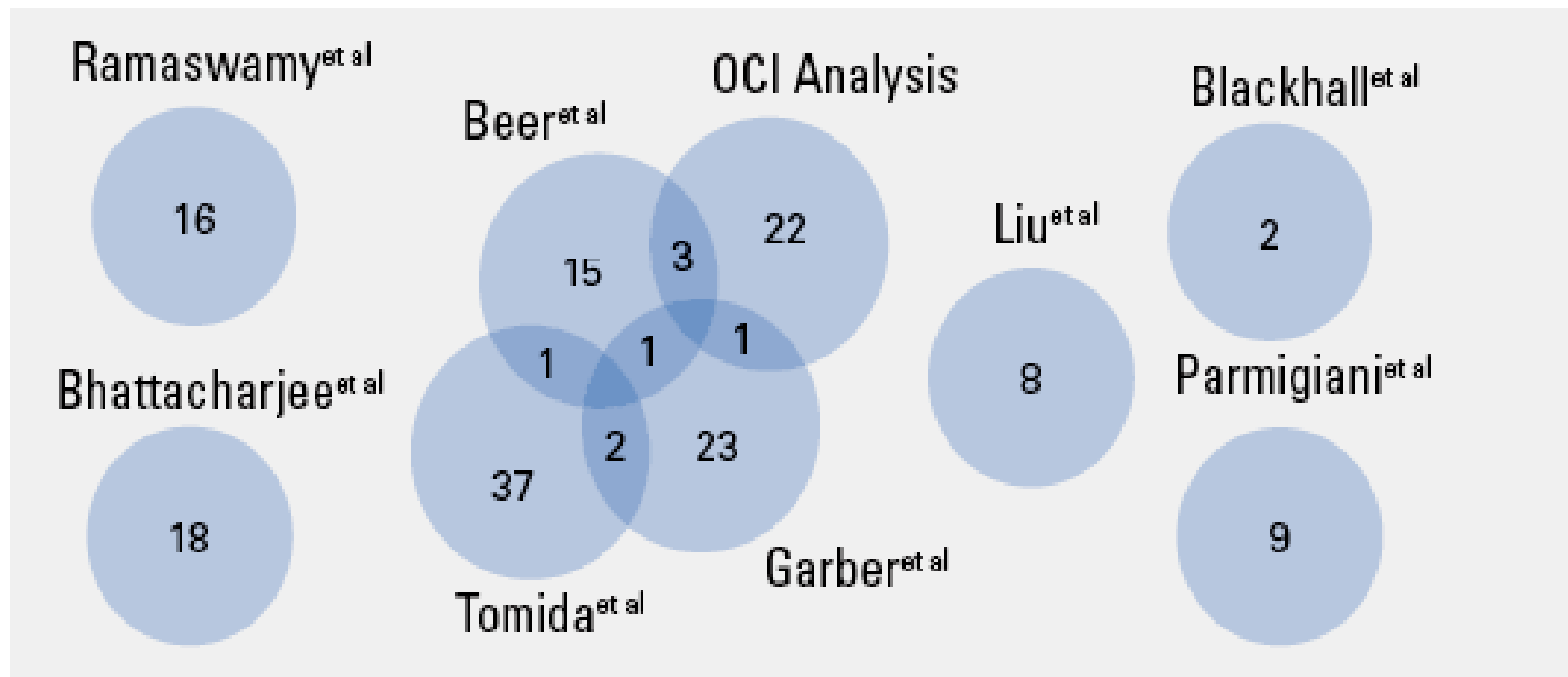
Journal of the National Cancer Institute, Vol. 95, No. 1, ..

*Richard Simon, Michael D. Radmacher, Kevin Dobbin, Lisa M. McShane*



# Les micropuces et le pronostic

## L'exemple des micropuces ARNm



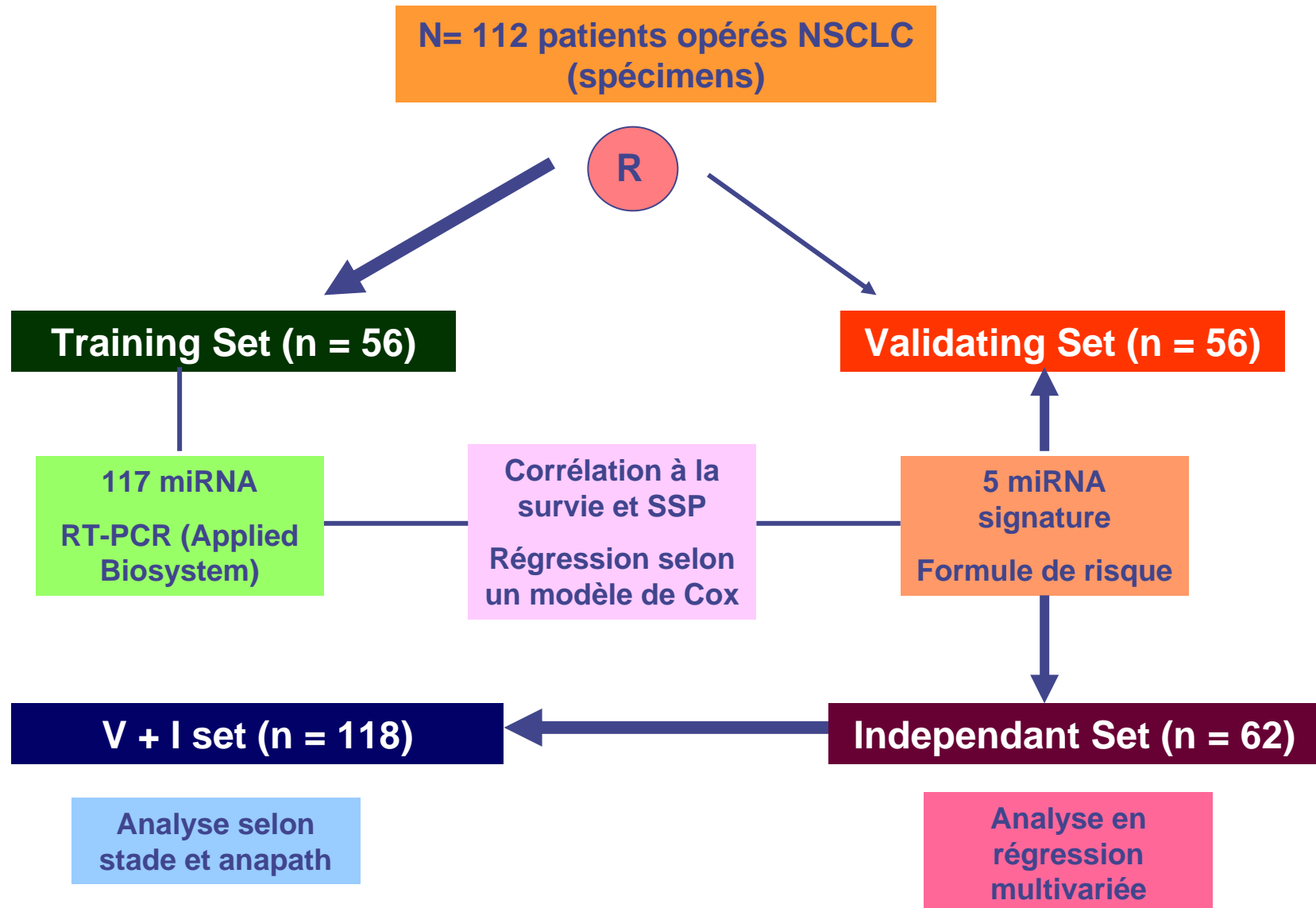
# microRNA et pronostic du cancer bronchique

Cancer Cell  
Article

## MicroRNA Signature Predicts Survival and Relapse in Lung Cancer

Sung-Liang Yu,<sup>1,2,3</sup> Hsuan-Yu Chen,<sup>2,6,7</sup> Gee-Chen Chang,<sup>9,11</sup> Chih-Yi Chen,<sup>10,12</sup> Huei-Wen Chen,<sup>13</sup> Sher Singh,<sup>14</sup> Chiou-Ling Cheng,<sup>2</sup> Chong-Jen Yu,<sup>4</sup> Yung-Chie Lee,<sup>5</sup> Han-Shiang Chen,<sup>15,16</sup> Te-Jen Su,<sup>2,11</sup> Ching-Cheng Chiang,<sup>2</sup> Han-Ni Li,<sup>2</sup> Qi-Sheng Hong,<sup>2</sup> Hsin-Yuan Su,<sup>2</sup> Chun-Chieh Chen,<sup>2</sup> Wan-Jiun Chen,<sup>13</sup> Chun-Chi Liu,<sup>11</sup> Wing-Kai Chan,<sup>3</sup> Wei J. Chen,<sup>2,6</sup> Ker-Chau Li,<sup>7,17,18</sup> Jeremy J.W. Chen,<sup>2,11,18</sup> and Pan-Chyr Yang<sup>2,4,8,18,\*</sup>

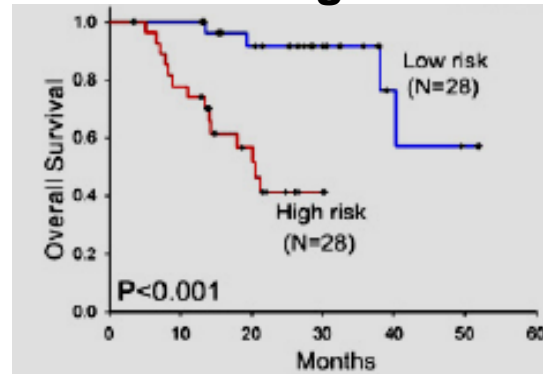
# microRNA et pronostic du cancer bronchique



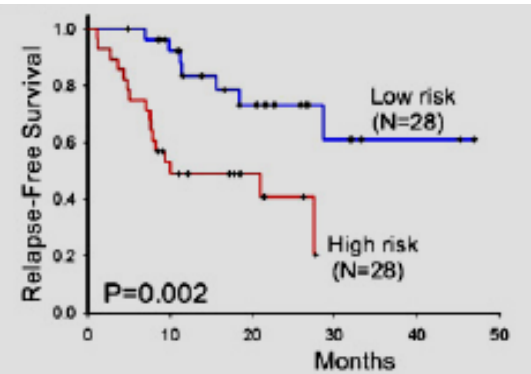
# microRNA et pronostic du cancer bronchique

Training Set

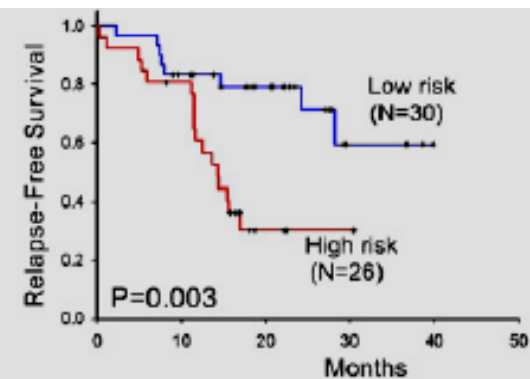
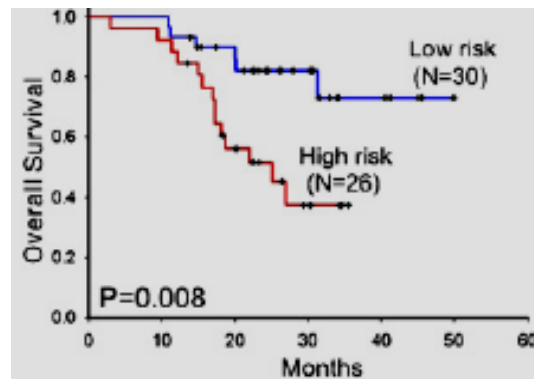
Survie globale



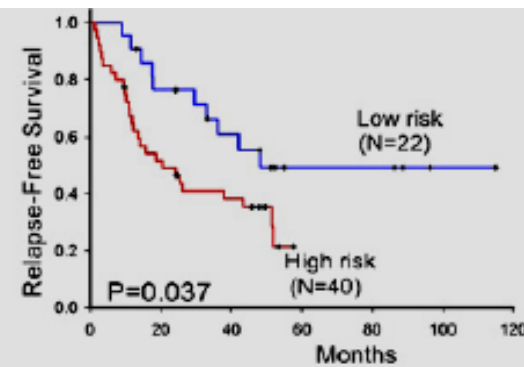
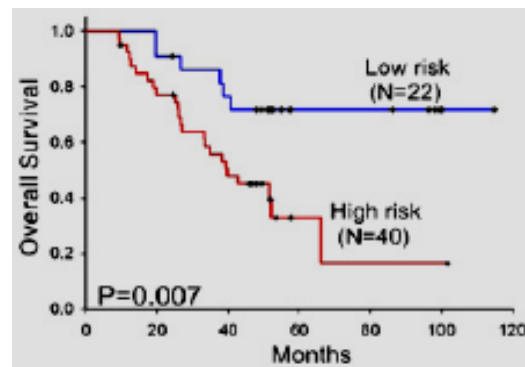
Survie sans récidive



Testing Set



Independant Set

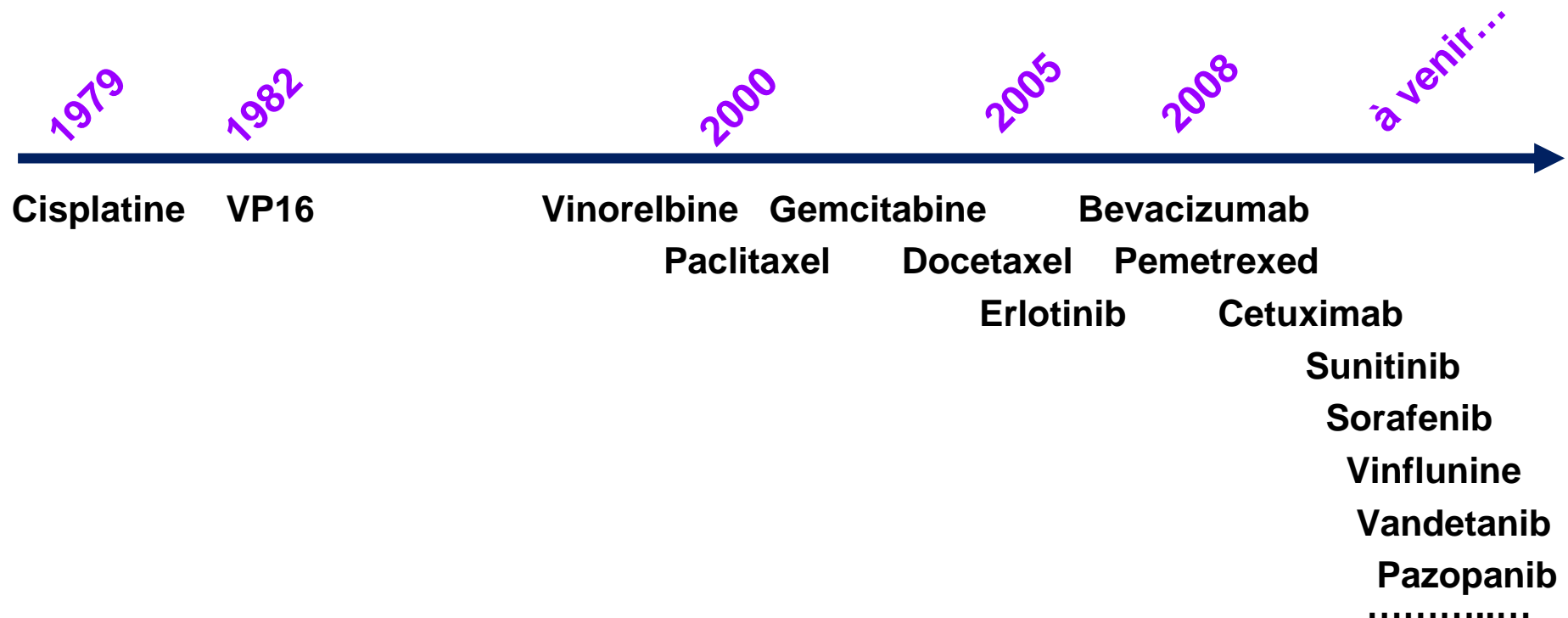




# En Pratique : facteurs prédictifs

Quelle est l'utilité des marqueurs prédictifs ?

Multiplicité des choix de molécules



# En Pratique : facteurs prédictifs

## Situation

adjuvant  
métastatique

## Marqueur

monomarqueur  
multimarqueur  
micropuces

## Technique

IHC  
RT-PCR  
Séquençage  
Microarray

**ERCC1**

**$\beta$ -tubulin**

**Thymidine Synthase**

**EGFR**

**Ras**

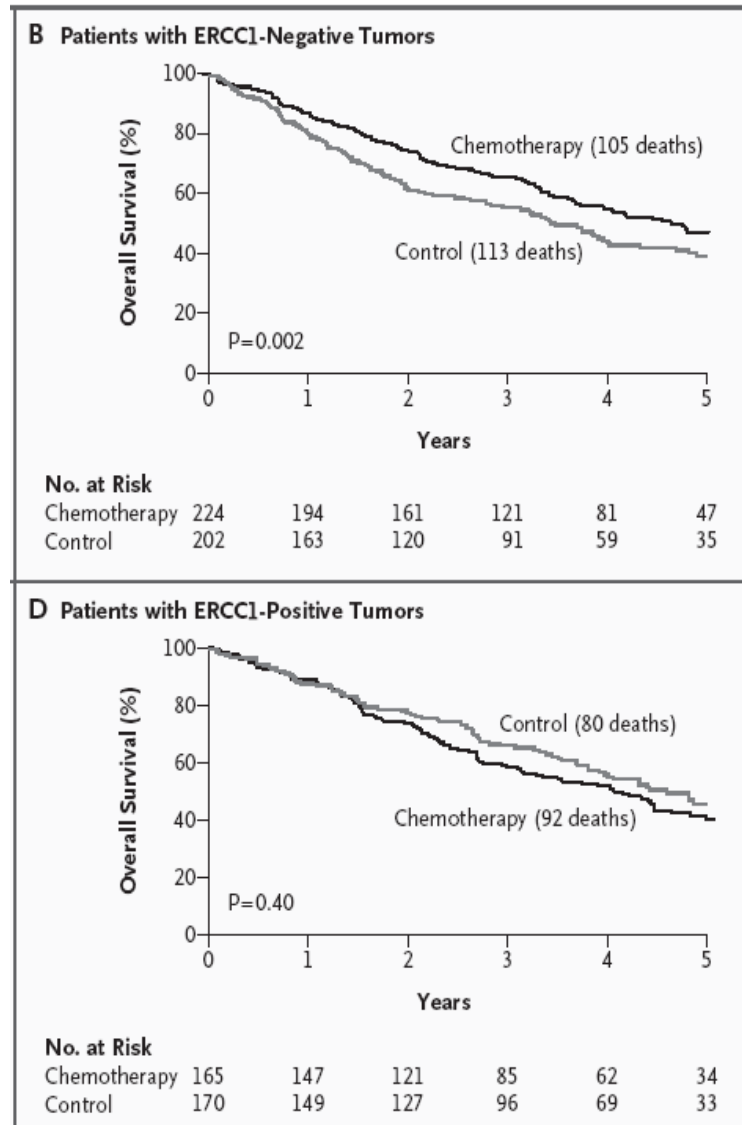
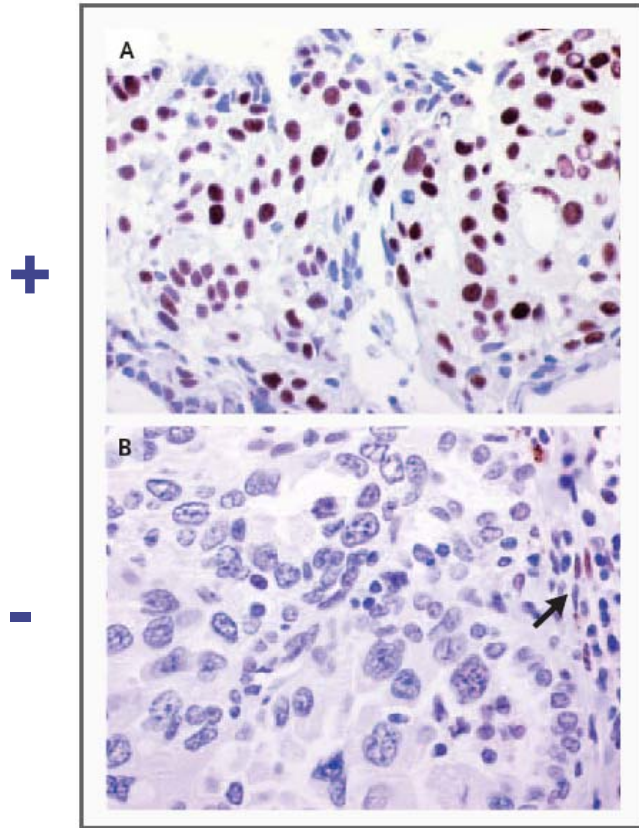
**p27**

**RRM1**

**Profils d'expression**

# Facteur prédictif : ERCC1

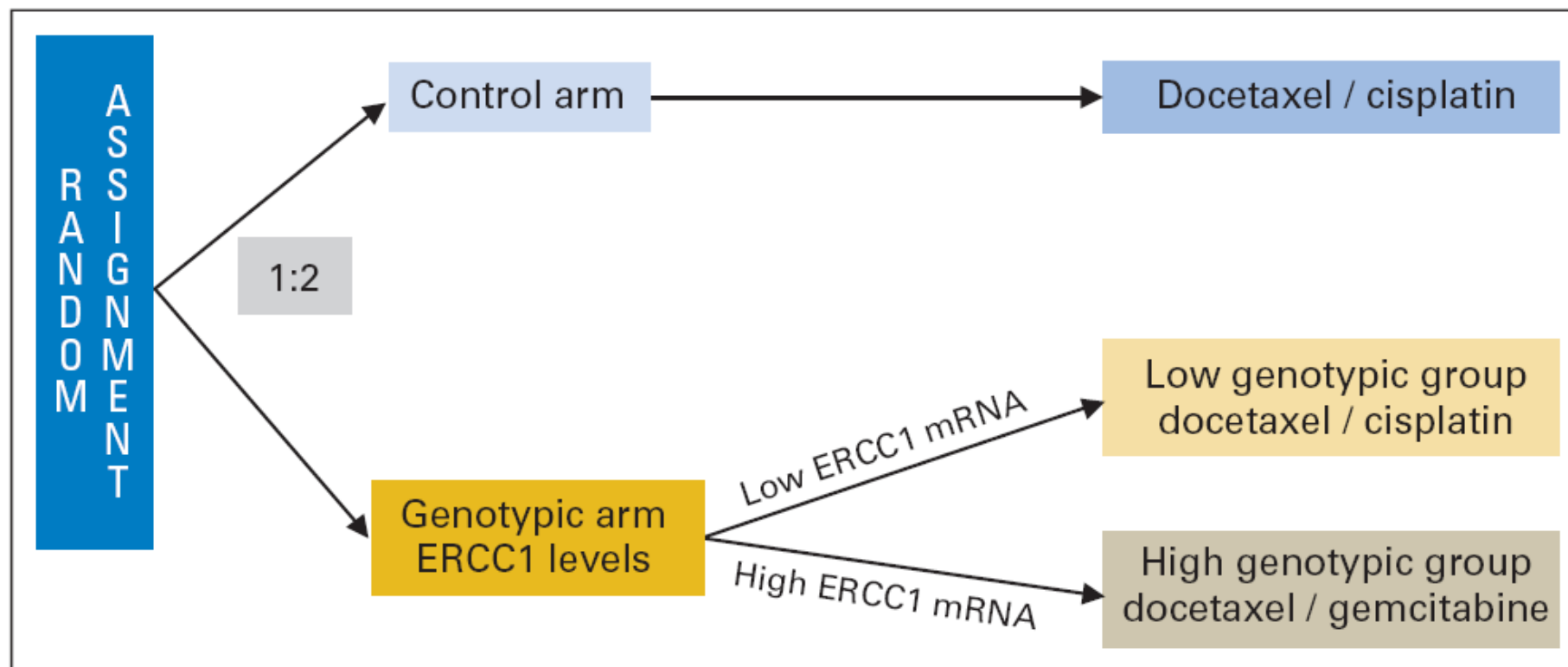
- Analyse ERCC1



Olaussen KA, Soria JC, NEJM 2006

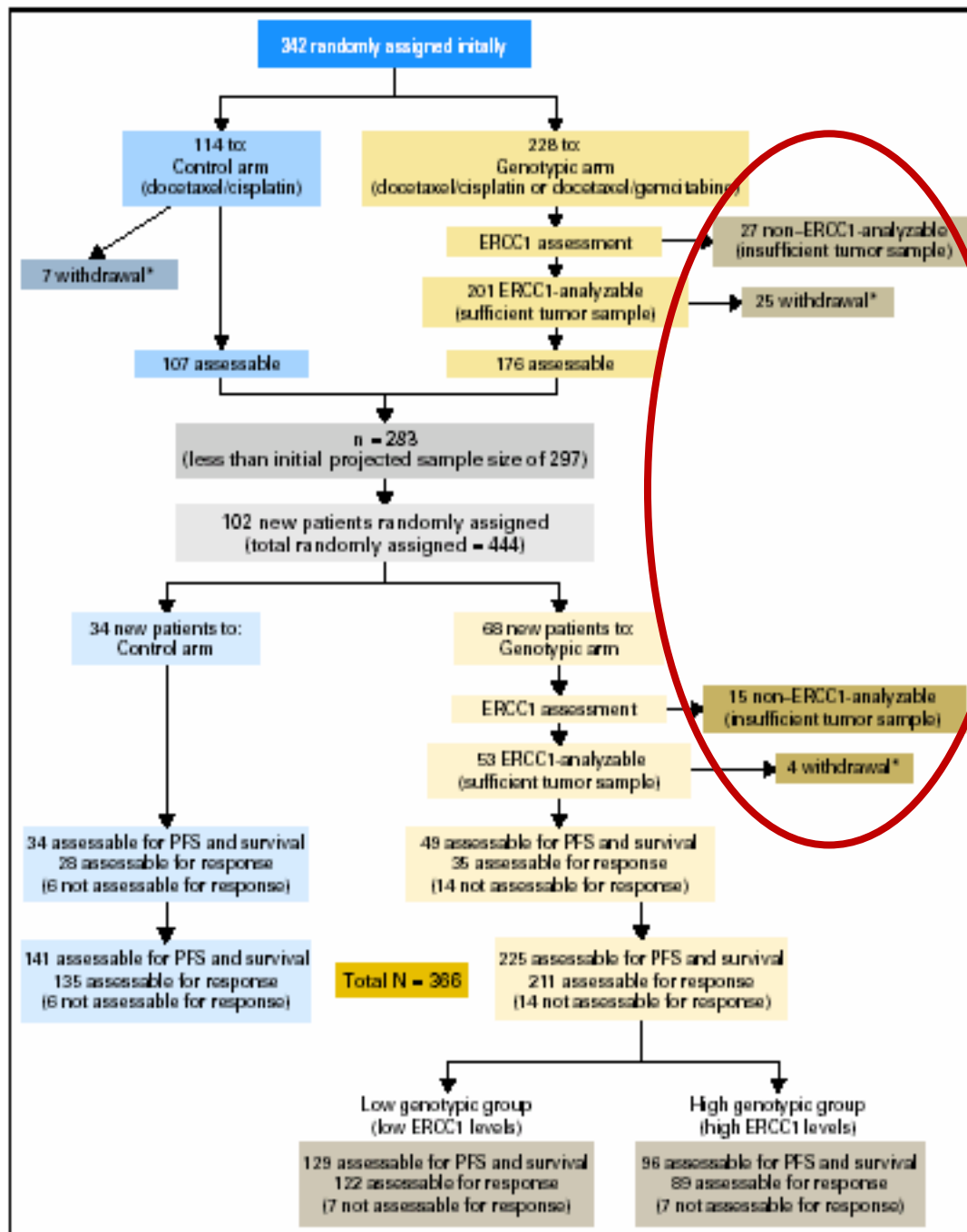
# Customizing Cisplatin Based on Quantitative Excision Repair Cross-Complementing 1 mRNA Expression: A Phase III Trial in Non–Small-Cell Lung Cancer

Manuel Cobo, Dolores Isla, Bartomeu Massuti, Ana Montes, Jose Miguel Sanchez, Mariano Provencio, Nuria Viñolas, Luis Paz-Ares, Guillermo Lopez-Vivanco, Miguel Angel Muñoz, Enriqueta Felip, Vicente Alberola, Carlos Camps, Manuel Domine, Jose Javier Sanchez, Maria Sanchez-Ronco, Kathleen Danenberg, Miquel Taron, David Gandara, and Rafael Rosell



# Marqueurs moléculaires : ERCC1

	Bras contrôle	Bras génotypique
<b>n</b>	141	225
<b>TR</b>	39.3 %	51.2 % *
<b>SSP</b>	5.2 m	6.1 m
<b>SG</b>	9.8 m	9.8 m



## Discussion méthodologique

Extraction ARN sur  
blocs en paraffine  
Taux d'échec : 42/296  
(14%)

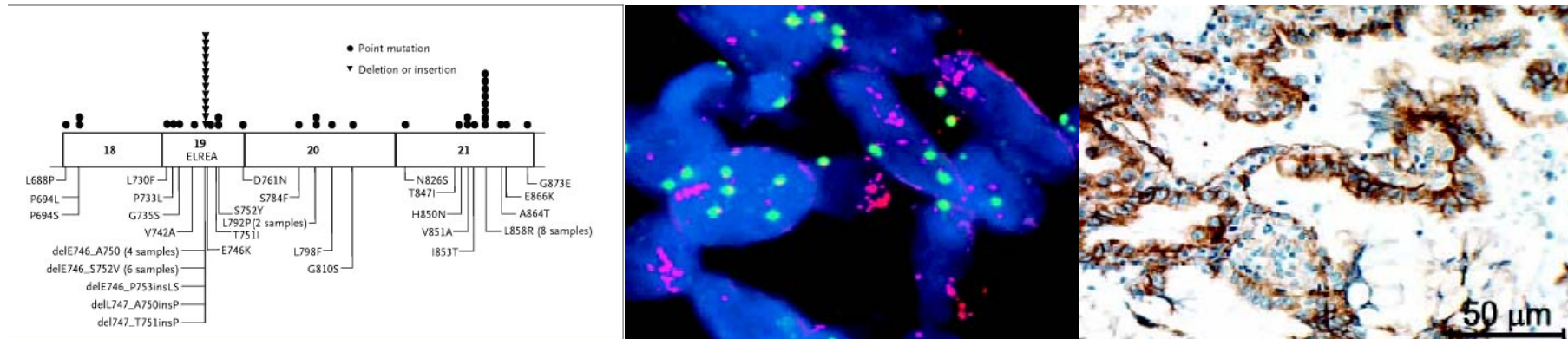
Taux d'exclusion :  
18%

Hétérogénéité des  
tissus

Contamination par du  
tissu sain



# Facteur prédictif : EGFR



Mutations du gène

Amplification

Expression protéique

# Facteur prédictif : EGFR (mutations)

Scienceexpress

Report

## *EGFR* Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy

J. Guillermo Paez,<sup>1,2\*</sup> Pasi A. Jänne,<sup>1,2\*</sup> Jeffrey C. Lee,<sup>1,3\*</sup> Sean Tracy,<sup>1</sup> Heidi Greulich,<sup>1,2</sup> Stacey Gabriel,<sup>4</sup> Paula Herman,<sup>1</sup> Frederic J. Kaye,<sup>5</sup> Neal Lindeman,<sup>6</sup> Titus J. Boggon,<sup>1,3</sup> Katsuhiko Naoki,<sup>1</sup> Hidefumi Sasaki,<sup>7</sup> Yoshitaka Fujii,<sup>7</sup> Michael J. Eck,<sup>1,3</sup> William R. Sellers,<sup>1,2,4†</sup> Bruce E. Johnson,<sup>1,2†</sup> Matthew Meyerson<sup>1,3,4†</sup>

Scienceexpress / www.scienceexpress.org / 29 April 2004 / Page 1 / 10.1126/science.1099314

The NEW ENGLAND  
JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

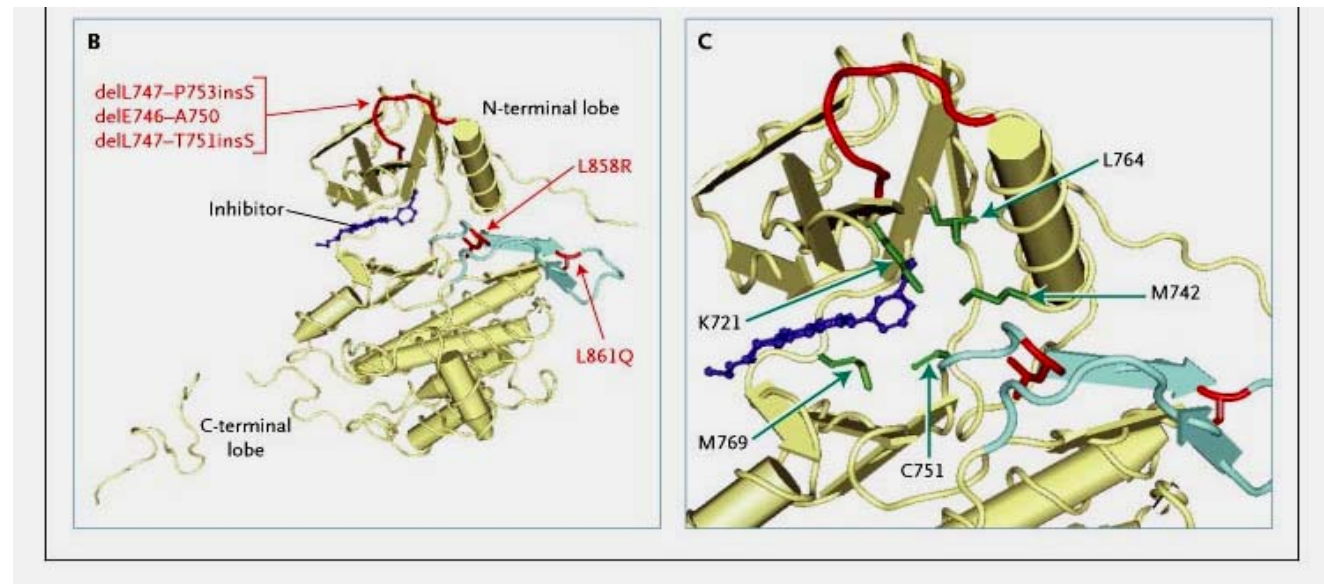
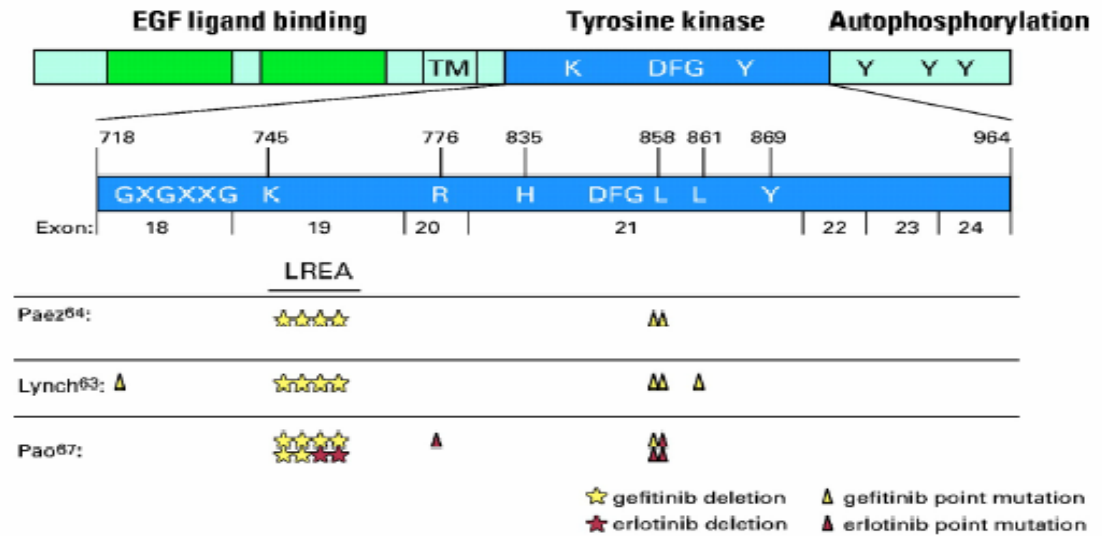
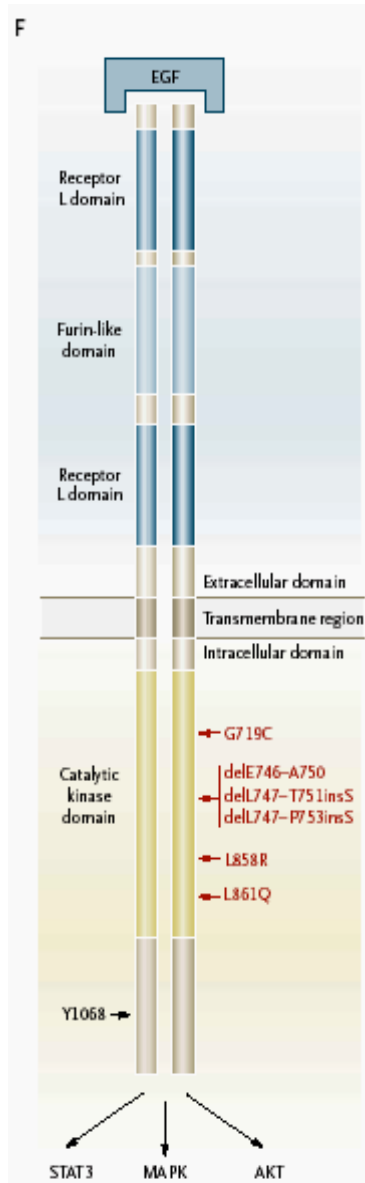
MAY 20, 2004

VOL. 350 NO. 21

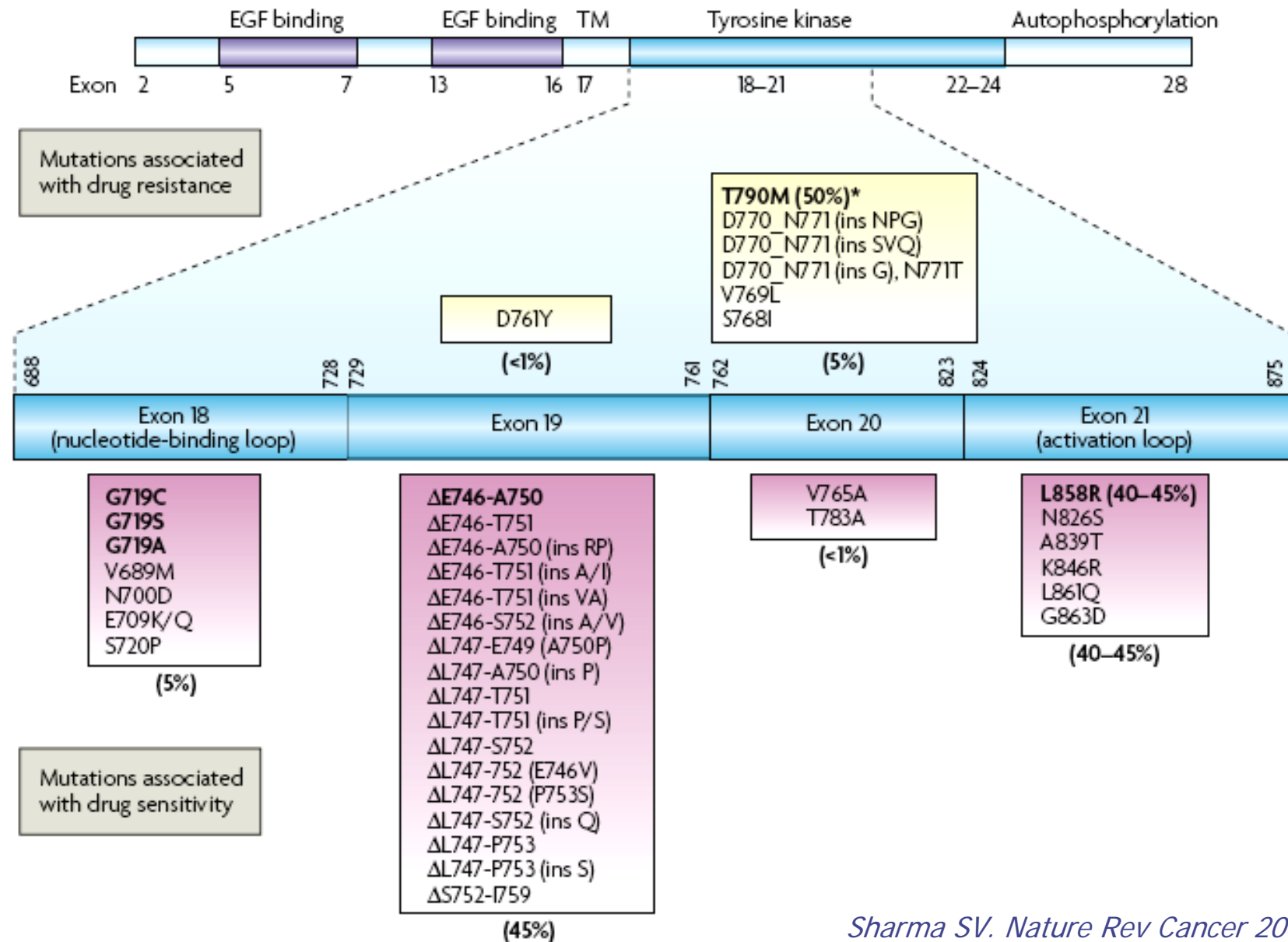
## Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib

Thomas J. Lynch, M.D., Daphne W. Bell, Ph.D., Raffaella Sordella, Ph.D., Sarada Gurubhagavatula, M.D., Ross A. Okimoto, B.S., Brian W. Brannigan, B.A., Patricia L. Harris, M.S., Sara M. Haserlat, B.A., Jeffrey G. Supko, Ph.D., Frank G. Haluska, M.D., Ph.D., David N. Louis, M.D., David C. Christiani, M.D., Jeff Settleman, Ph.D., and Daniel A. Haber, M.D., Ph.D.

# Facteur prédictif : EGFR



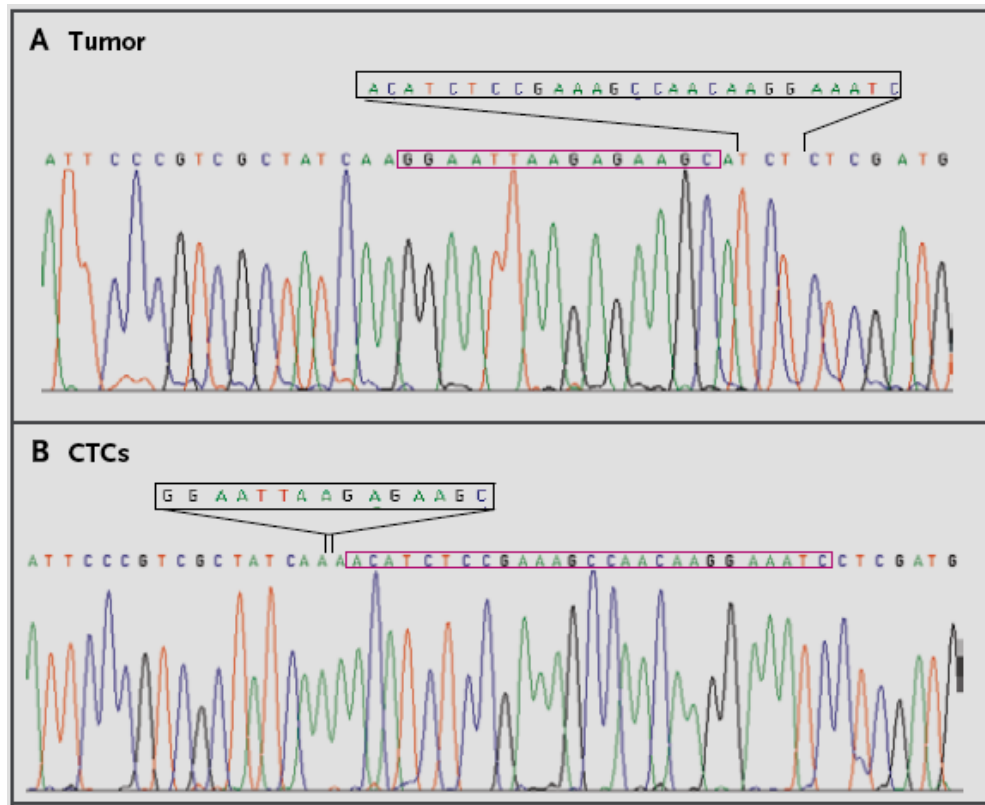
# Facteur prédictif : EGFR



# Matériel : sang (cellules tumorales circulantes)

## Detection of Mutations in *EGFR* in Circulating Lung-Cancer Cells

Shyamala Maheswaran, Ph.D., Lecia V. Sequist, M.D., M.P.H.,



**N = 27 NSCLC avec mutation EGFR**

**Meilleure corrélation / ADN plasmatique**

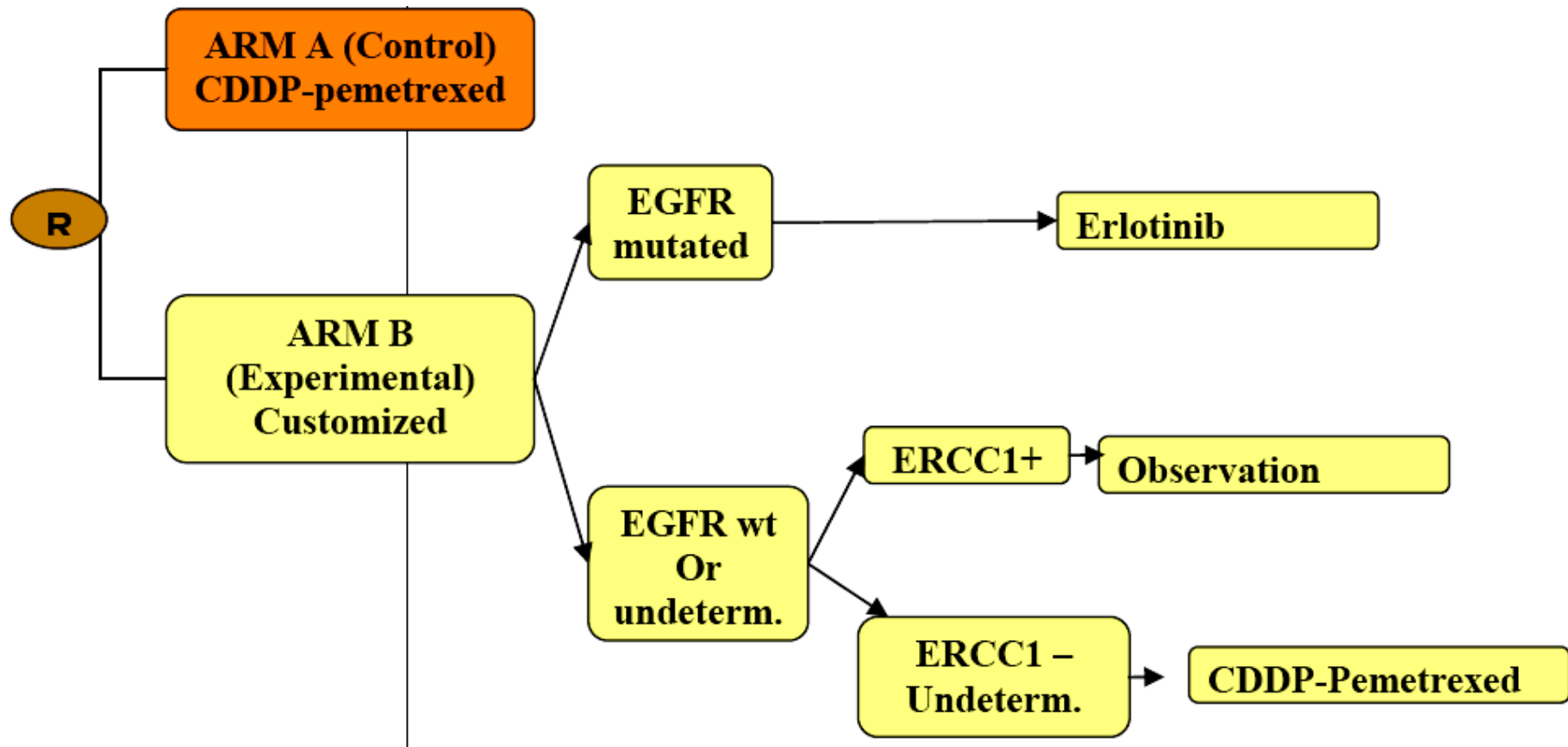
**Diagnostic de mutation T790M (facteur pronostic)**

**Diagnostic de nouvelles mutations dans les CTC**

# Facteur prédictif : EGFR

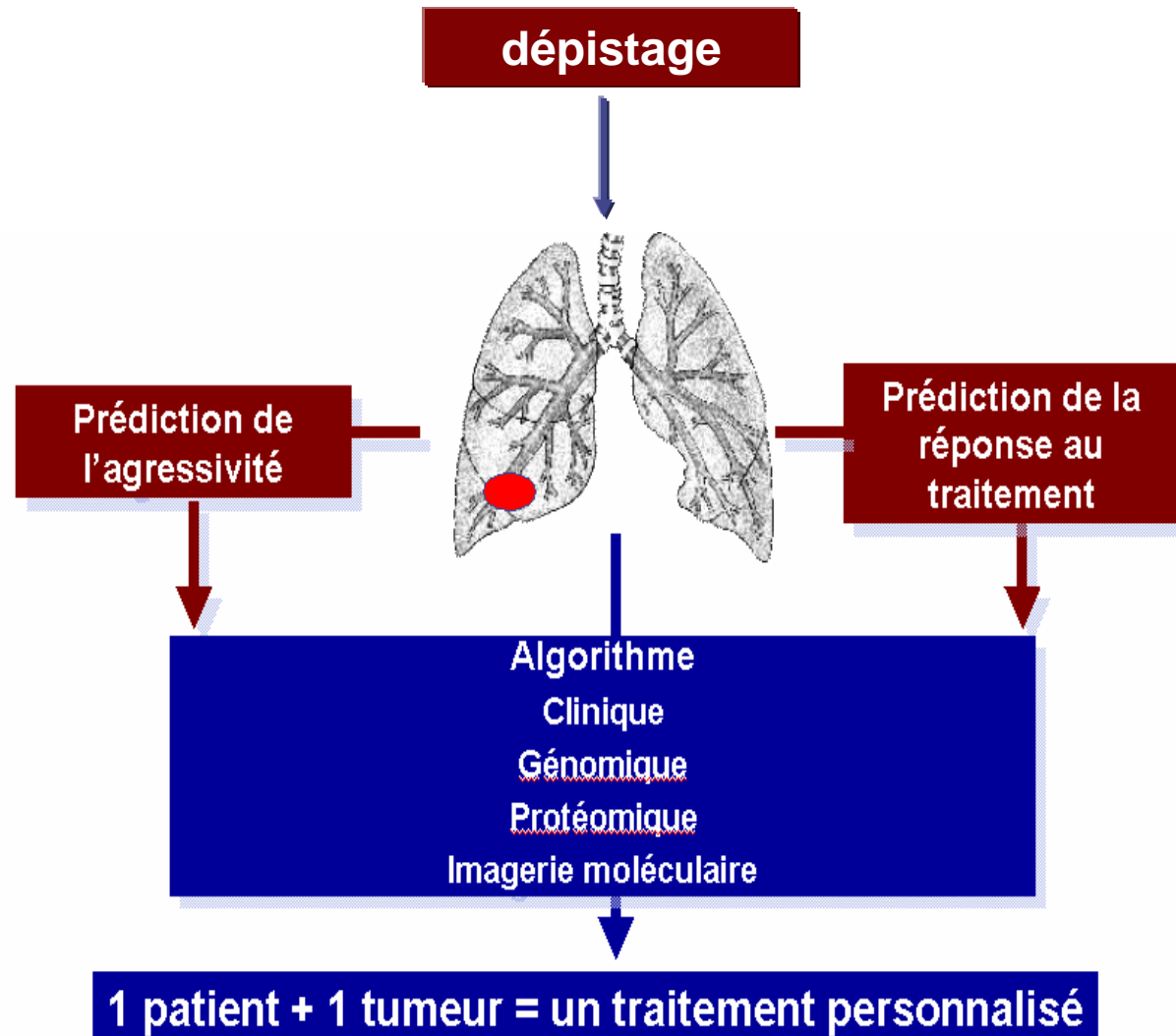
Essai	Molécule	EGFR	TR (%)	SG (m)
Mok T. NEJM 09	G vs CT	Mut	71 vs 47	19 vs 17
Rosell NEJM 09	E	Mut	70,6	27
Douillard (Lancet 08)	E vs D	Mut	NR	14.6 (E=D)
Yang C (ASCO 08)	BIBW2992	Mut	80%	NR
Jackman (ASCO 08)	E ou G	Mut	63%	23.6
Inoue (JCO 2009)	G (PS 3-4)	Mut	66%	17.8
Morita (ASCO 08)	G	Mut	77%	24
Sirera (ESMO 08)	E	Mut	73%	24
Sequist (JCO 08)	G	Mut	55%	17.5

# Essai adjuvant (IFCT 0801)





# Biologie et prise en charge du cancer bronchique



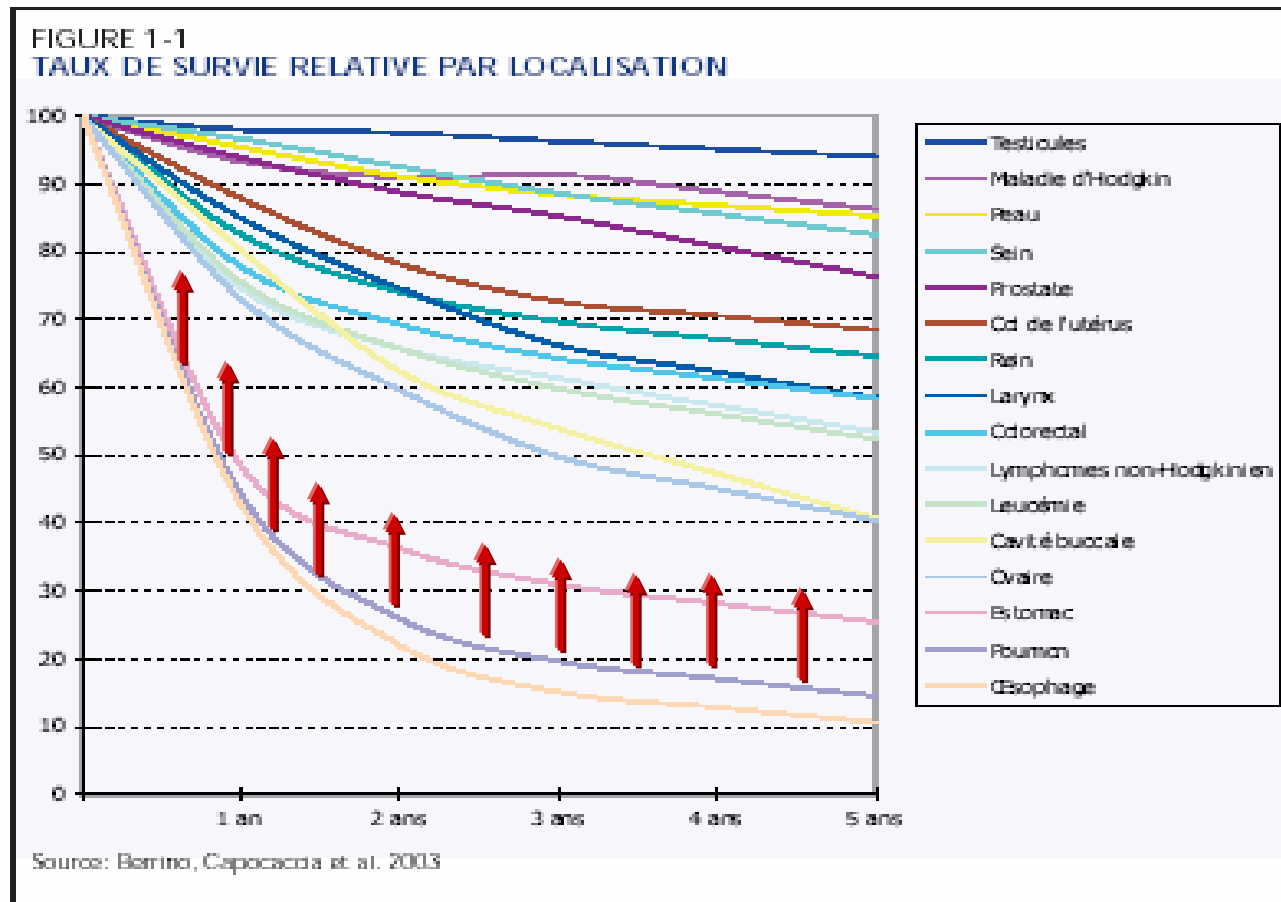
# **Biologie et prise en charge du cancer bronchique**

**« agir en Homme de pensée et penser en Homme  
d'action » Bergson**

**Éviter « d'agir en Homme d'action » ou de « penser en  
Homme de pensée »**

**Validation de toutes ces hypothèses par une recherche  
clinique rigoureuse.**

# La biologie des cancers bronchiques



# Dépistage : Test anticorps

## Biosystems International SAS Initiates Development of a Diagnostic Blood Test for Lung Cancer

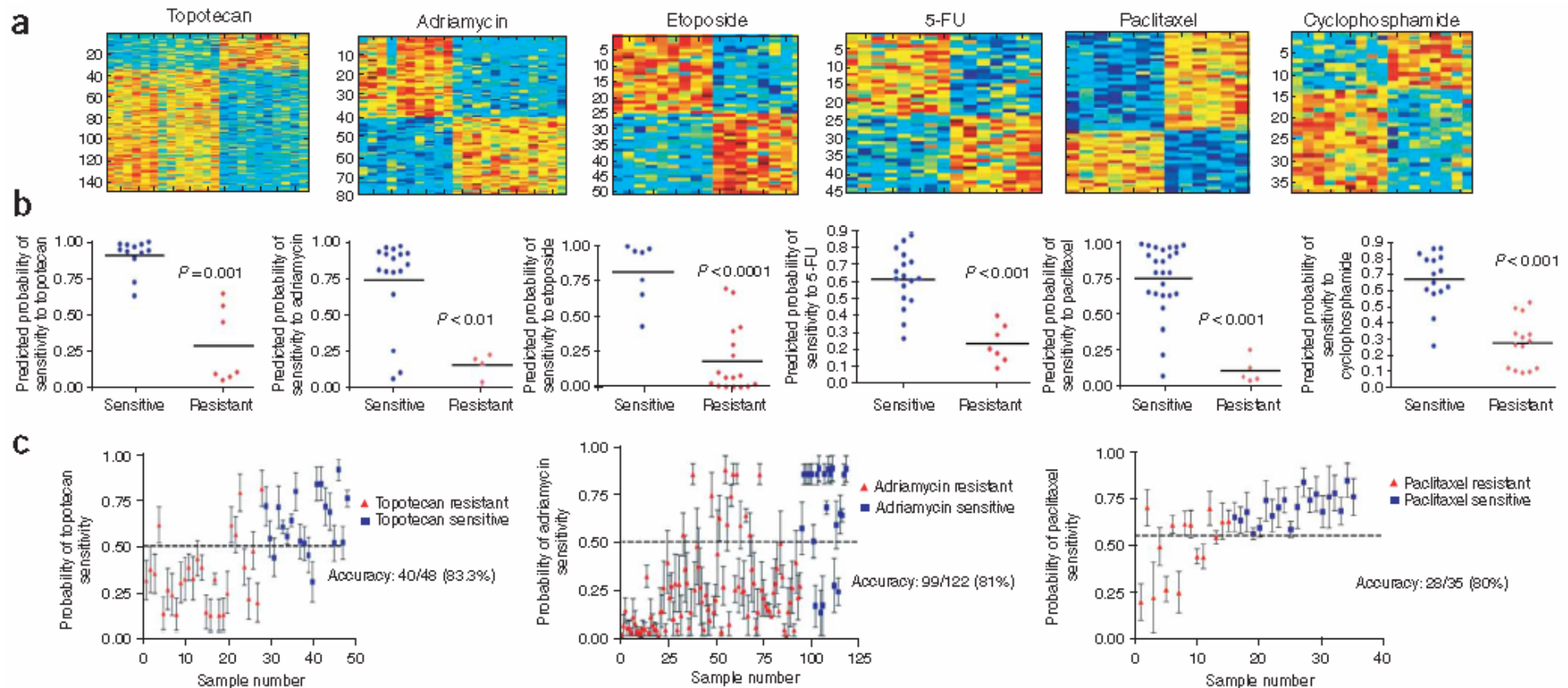
- **France**
- **Prélèvements sanguins**
- **Détection d'anticorps spécifiques du cancer bronchique**
- **n = 367 patients et 304 contrôles**
- **Sensibilité > 80% et spécificité > 80% (pour exemple PSA sn = 35%, sp = 63%)**
- **Confirmation sur une série de 128 stade I**
- **Différents profils selon les types anatomopathologiques**

# Micropuces prédictives

## Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics

nature  
medicine

Anil Potti<sup>1,2</sup>, Holly K Dressman<sup>1,3</sup>, Andrea Bild<sup>1,3</sup>, Richard F Riedel<sup>1,2</sup>, Gina Chan<sup>4</sup>, Robyn Sayer<sup>4</sup>, Janiel Cragun<sup>4</sup>, Hope Cottrill<sup>4</sup>, Michael J Kelley<sup>2</sup>, Rebecca Petersen<sup>5</sup>, David Harpole<sup>5</sup>, Jeffrey Marks<sup>5</sup>, Andrew Berchuck<sup>1,6</sup>, Geoffrey S Ginsburg<sup>1,2</sup>, Phillip Febbo<sup>1-3</sup>, Johnathan Lancaster<sup>4</sup> & Joseph R Nevins<sup>1-3</sup>



# Micropuces prédictives

