

Les CBNPC métastatiques mutés ou réarrangés Comment déterminer la cible ?

Michèle Beau-Faller

Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire
Plate-forme de Génomique Moléculaire des Cancers d'Alsace (PGMCA)
EA 3430 Groupe « Progression tumorale et microenvironnement. Approches translationnelles et épidémiologie »
CHU Strasbourg

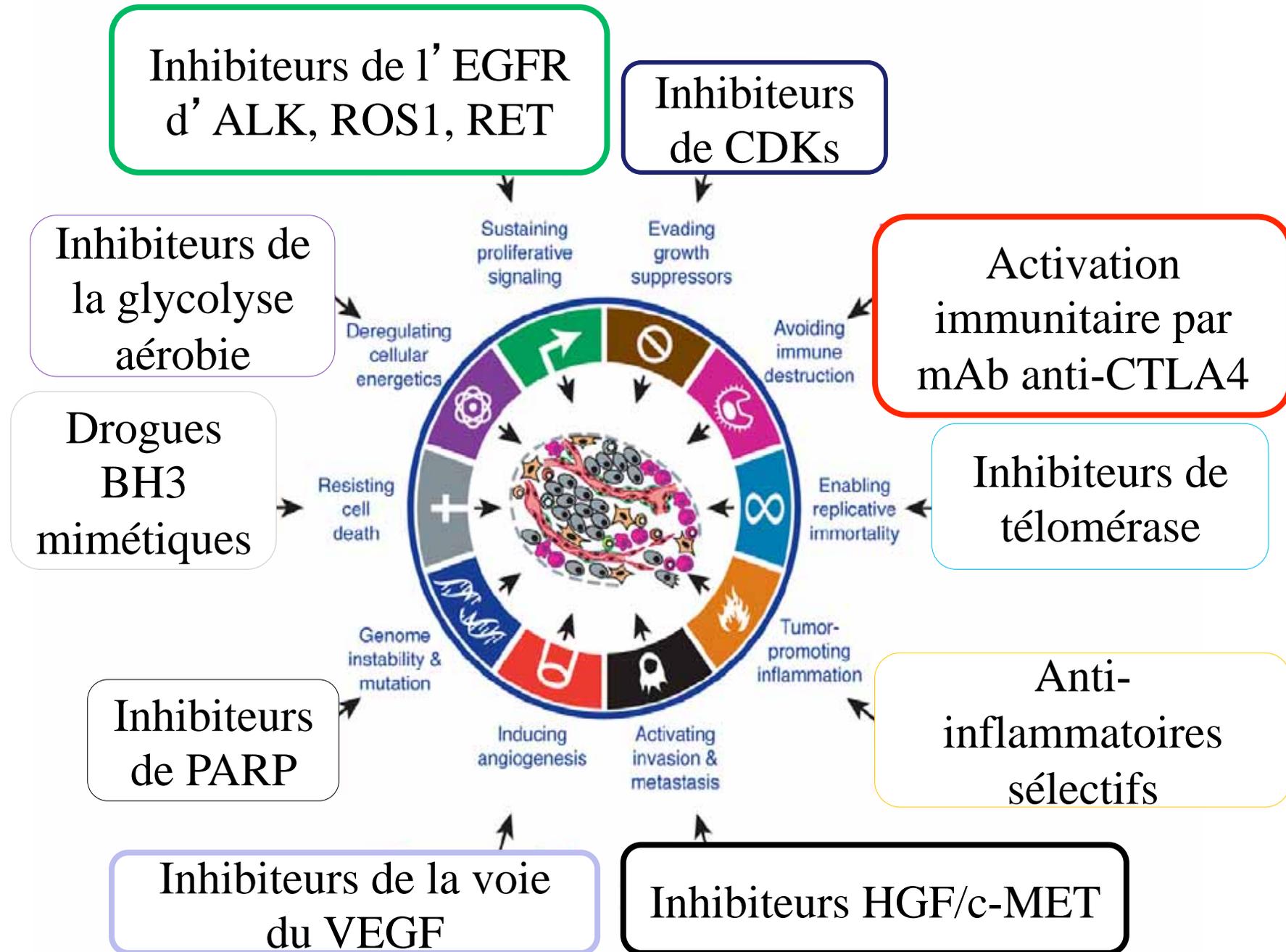
Conflits d'intérêts

Roche

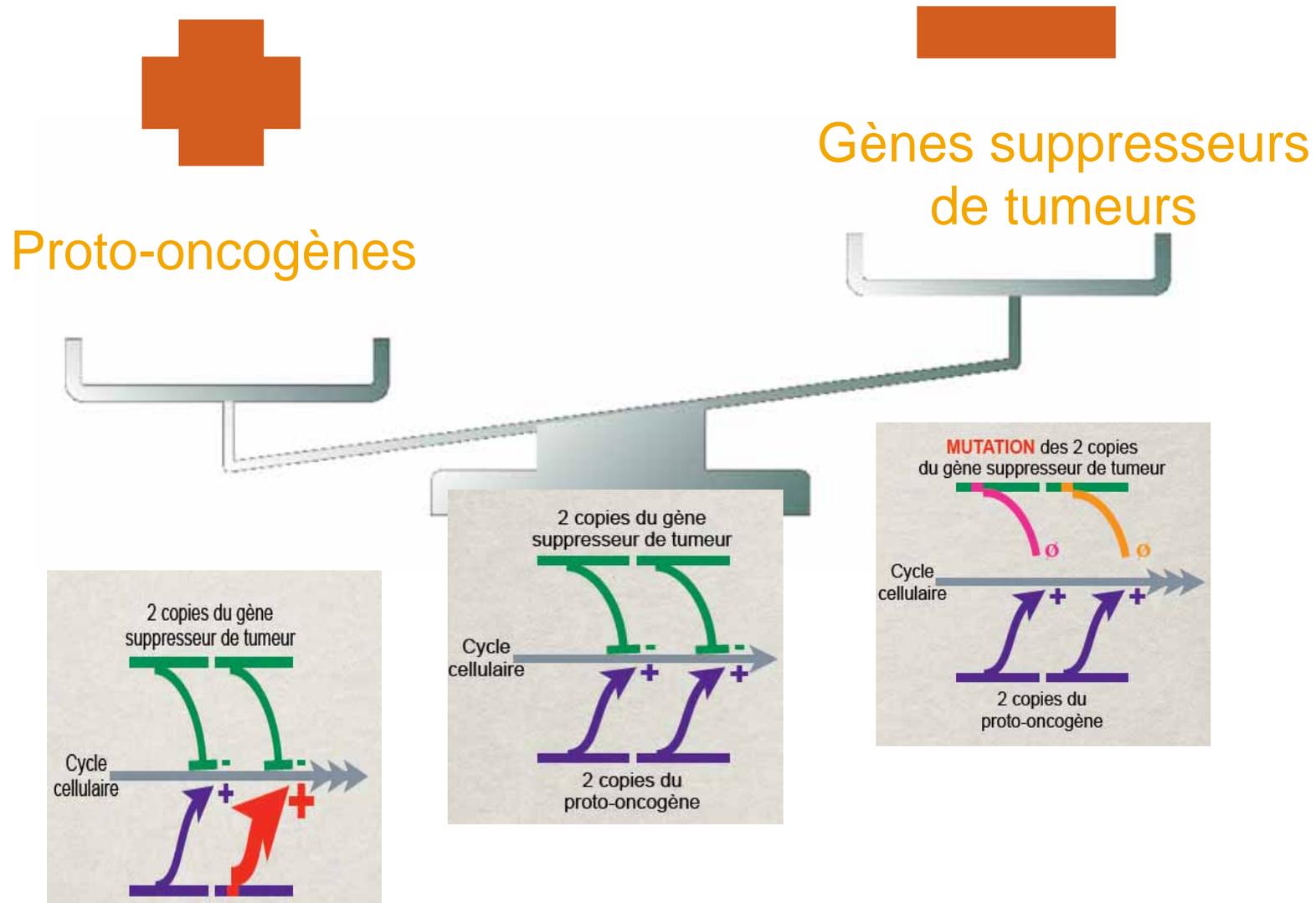
Astra-Zeneca

Boehringer-Ingelheim

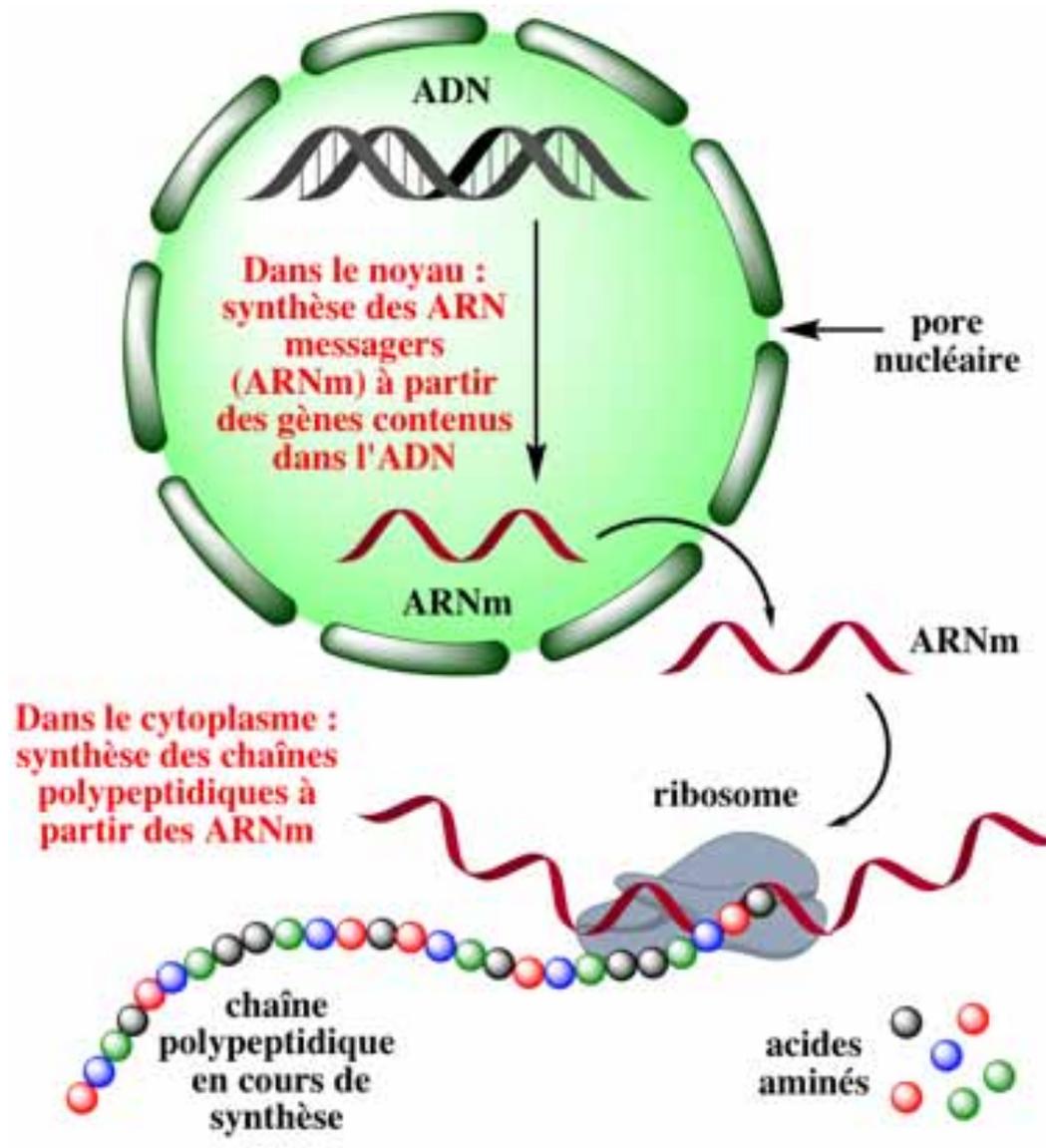
- **Introduction**
- Quel échantillon analyser?
- Quels critères de qualité de l' échantillon?
- Les techniques de biologie moléculaire
- Le futur proche
- La recherche des translocations
- L' interprétation des résultats



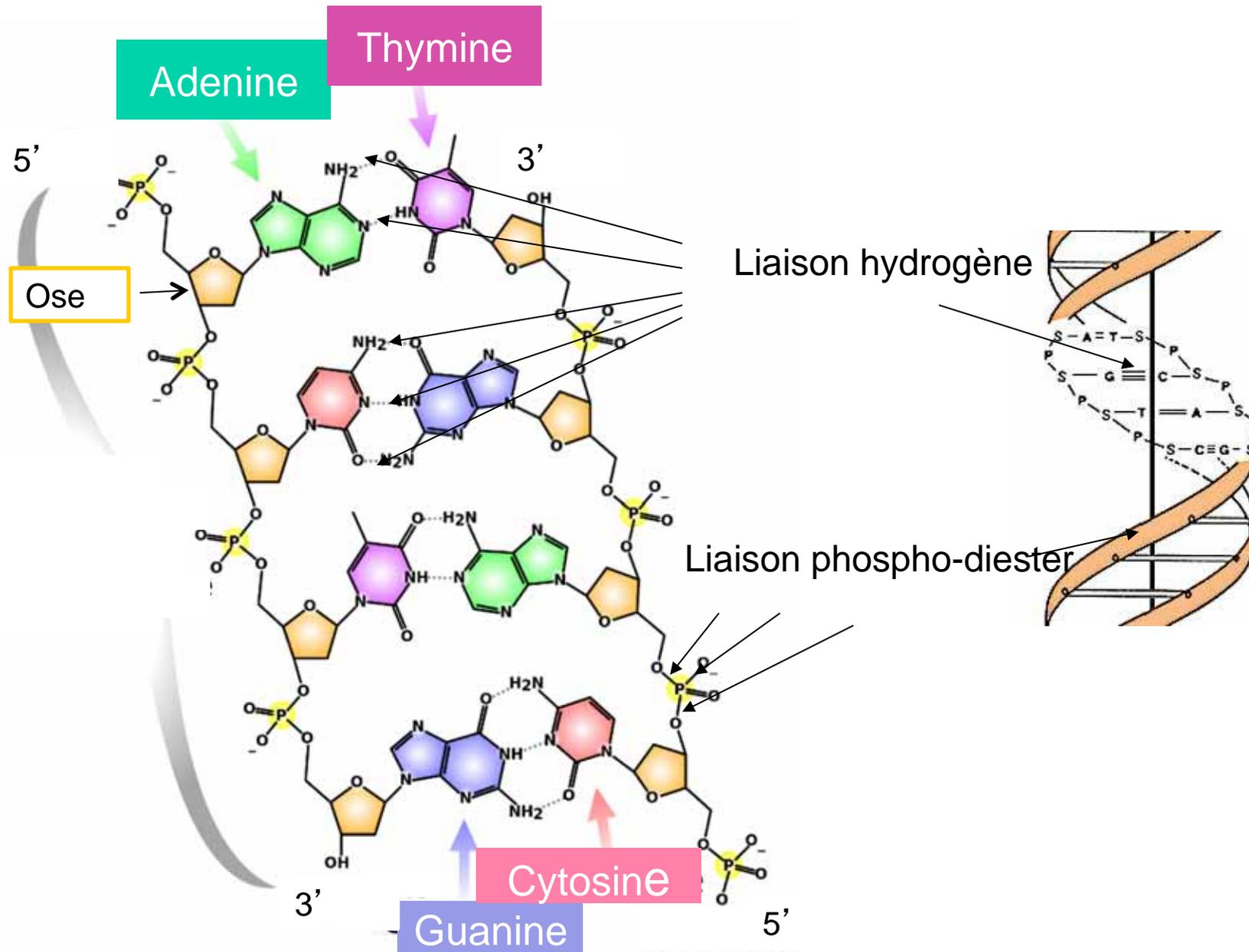
Oncogenèse: déséquilibre oncogènes / gènes suppresseurs de tumeur



De l'ADN à la protéine

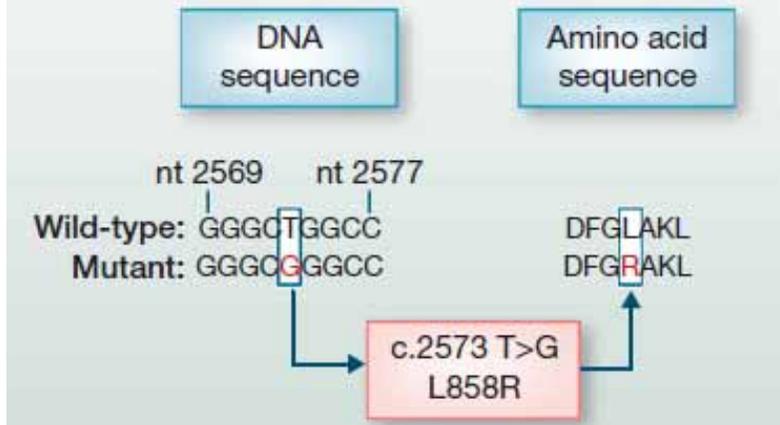


La structure de l'ADN: en double hélice

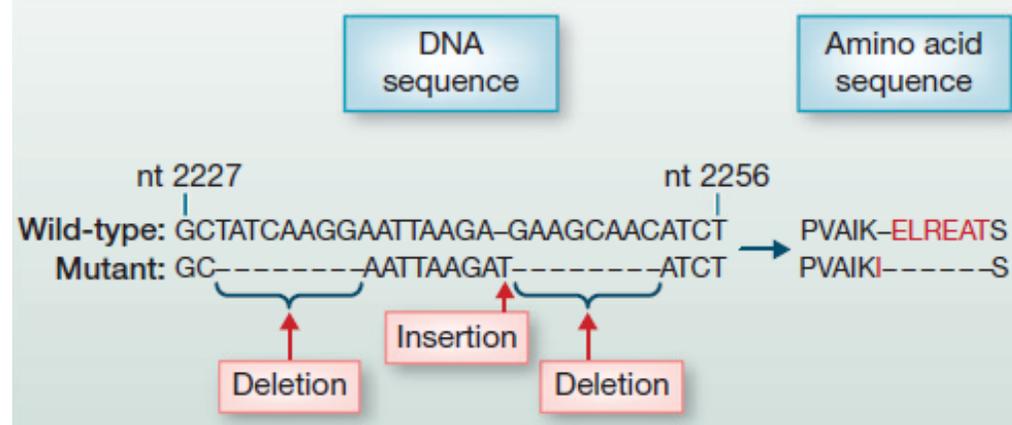


Exemples d'altérations génomiques « driver » en cancérologie

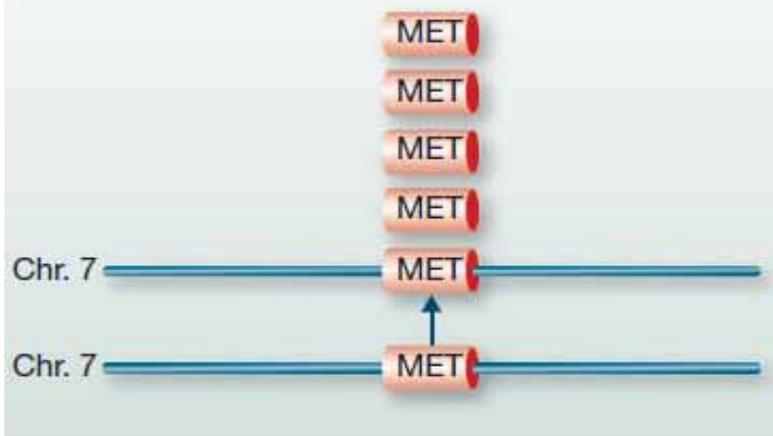
Single-nucleotide variant: EGFR L858R (exon 21)



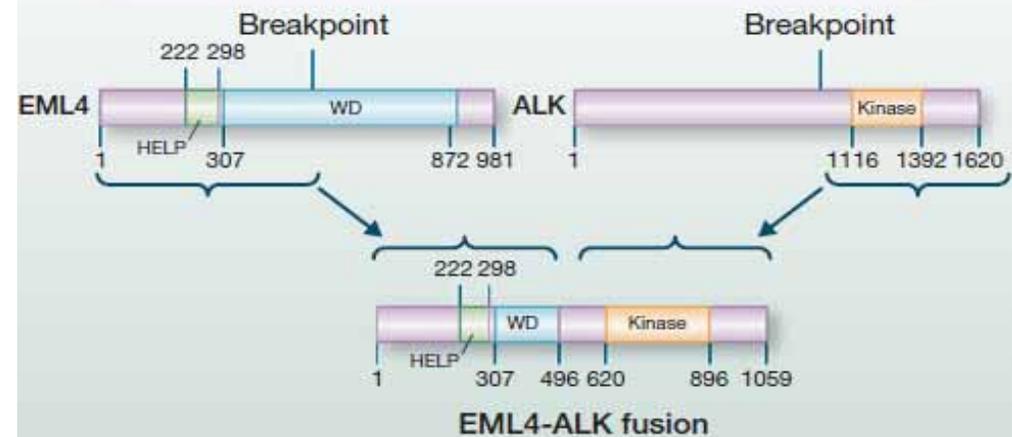
Combined insertion/deletion: EGFR exon 19 indel



Copy-number variant: MET amplification



Structural variant: EML4-ALK fusion



Insuffisance des données cliniques

n= 223 (5 essais)

90% caucasiens

Par séquençage (et DHPLC)

84 mutés (37%)

Outcomes by number of clinical predictors

	3 + clinical predictors	2 or fewer	p
N	59	164	
RR	29/59 (49%)	32/164 (20%)	<0.001
Median TTP	9.1	4.4	0.0165
Median Survival	20.8	14.7	0.1139

	Sensitizing EGFR Mutation	Other	p		Sensitizing EGFR Mutation	Other	p
N	38	21		N	44	118	
RR	29/38 (76%)	0/21 (0%)	<0.001	RR	27/46 (59%)	5/118 (4%)	<0.001
Median TTP	12.9	1.8	<0.0001	Median TTP	10.8	2.5	<0.0001
Median Survival	23.8	14.8	0.0515	Median Survival	24.5	11.8	0.0016

Outcomes of clinically enriched patients by EGFR mutation status
Outcomes of clinically unenriched patients by EGFR mutation status

- La probabilité de trouver une mutation de l'EGFR dans une population sélectionnée sur des critères cliniques et histologiques, n'est que de 60%

Insuffisance des données histologiques

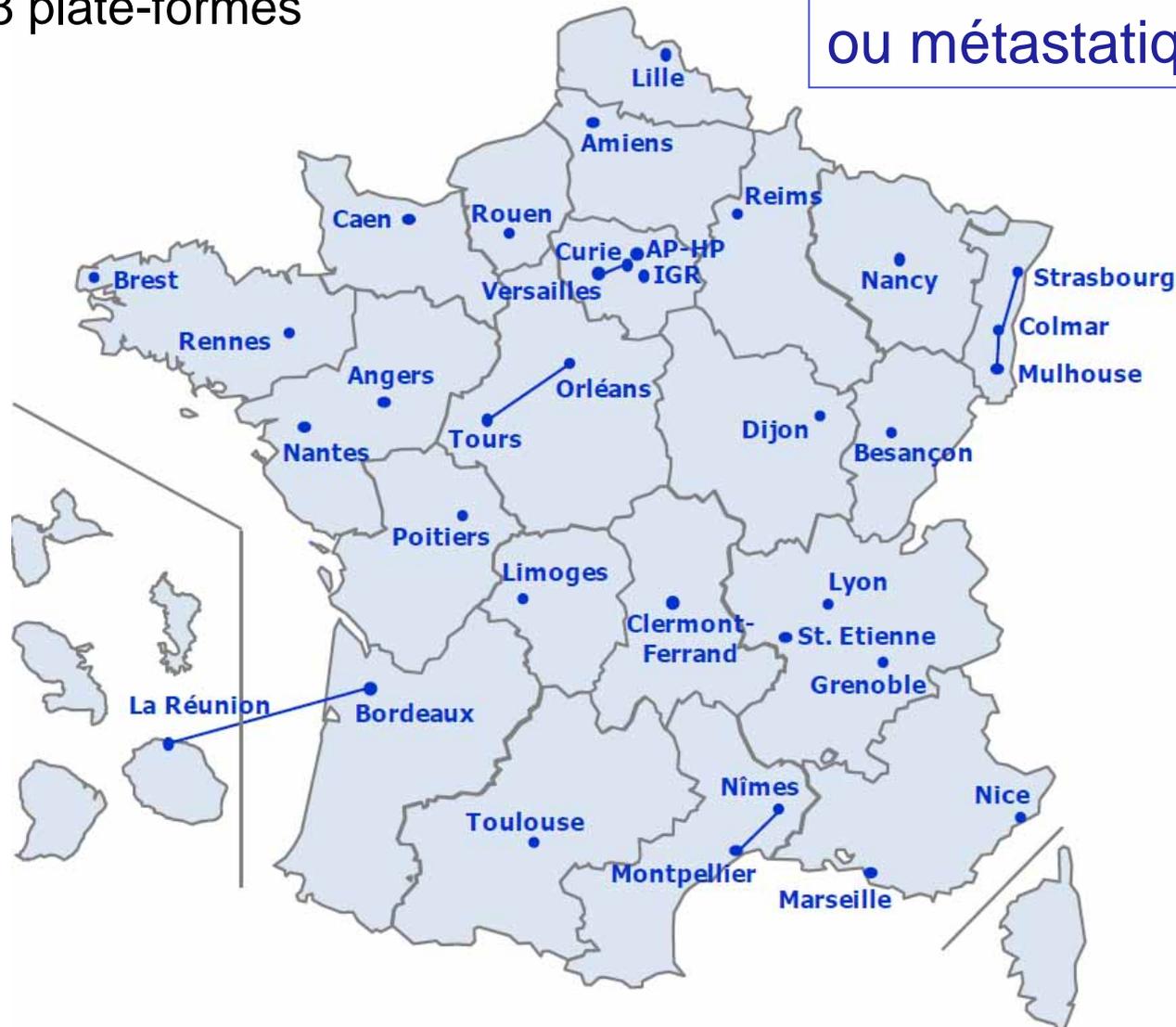
- Mutations de l'EGFR / translocations ALK à rechercher si composante adénocarcinomateuse
 - OUI: adénocarcinomes, carcinomes mixtes avec composante adénocarcinomateuse, carcinomes adéno-squameux
 - NON: carcinome épidermoïde pur, CBPC

 - Sous-types d'adénocarcinomes
 - Mutations EGFR: bas grade, avec composante lépidique, papillaire ou acinaire, non mucineux
 - Translocation ALK: composante solide et/ou en bague à chatons
-
- Modèles de prédiction?
 - Analyse moléculaire indispensable

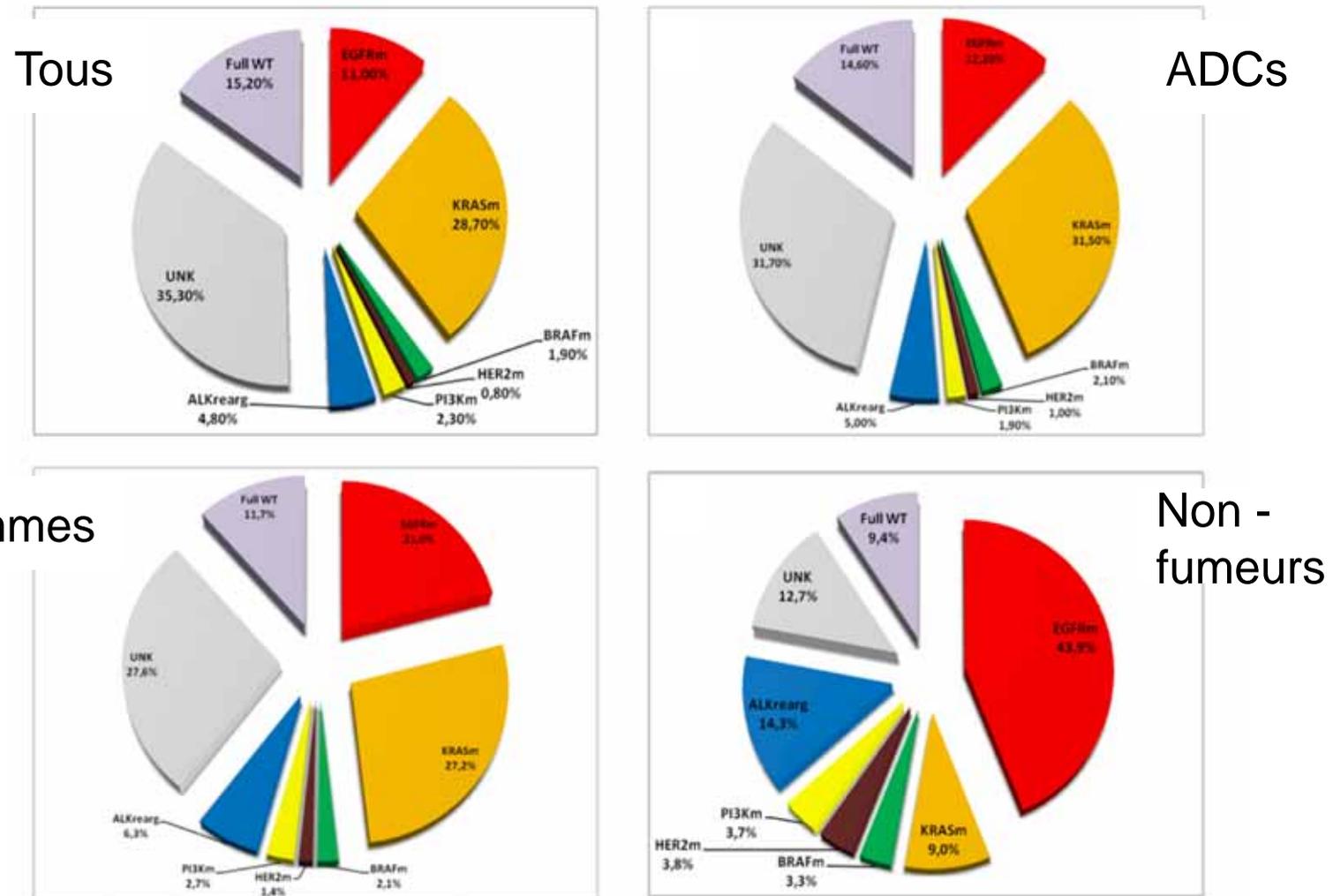
Plate-formes: la carte

28 plate-formes

➤ CBNPC non épidermoïde
de stade localement avancé
ou métastatique

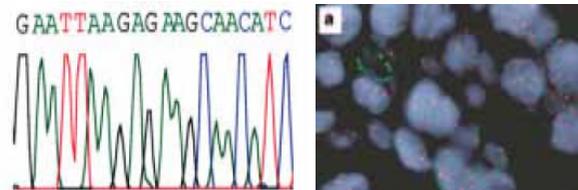


BioMarqueurs France



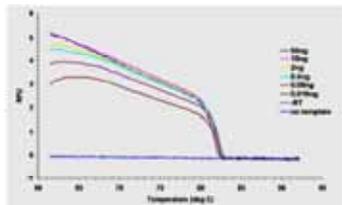
n = 18679 échantillons
6 gènes analysés

Quel échantillon pour quelle altération?



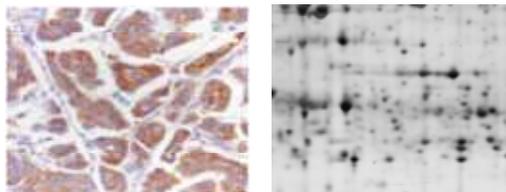
DNA

- . Mutations or single nucleotide polymorphisms (SNP)
- . Gene amplification
- . Epigenetic alterations (methylation)
- . *Rearrangements*



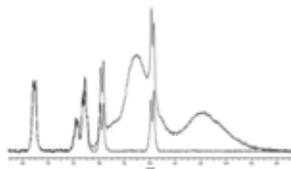
RNA

- . Quantitative analysis of RNA (*gene expression, miRNAs*)
- . *Rearrangements*



Proteins

- . Immunochimistry, proteomics...



Metabolites

- . Mass spectrometry, RMN, sequenom, (HRMAS)...

Quelle techniques pour les altérations génomiques?

DNA alteration	Techniques
Mutation	Direct sequencing Alternative molecular techniques Next-Generation Sequencing (NGS) Immunohistochemistry (IHC) <i>(neoprotein/fusion protein)</i>
Gene amplification	Real-time QPCR CGH array Next-Generation Sequencing (NGS) ISH, IHC <i>(surexpression)</i>
Translocation	RT-QPCR ISH, IHC <i>(neoprotein/fusion protein)</i> Next-Generation Sequencing (NGS)

- Introduction
- **Quel échantillon analyser?**
- Quels critères de qualité de l' échantillon?
- Les techniques de biologie moléculaire
- Le futur proche
- La recherche des translocations
- L' interprétation des résultats

Hétérogénéité intra-tumorale: cellules tumorales et cellules normales



Les différents prélèvements tissulaires en vue du génotypage

- Biopsies bronchiques
 - Succès < 60%
 - Recommandations: au moins 3 biopsies en zone tumorale

 - Ponctions-biopsies par EBUS-TBNA
 - Succès 70-90% des cas
 - Possibilité de prélèvements ultra-microscopiques

 - Ponctions-biopsies sous scanner
 - Calibre de l' aiguille: 20G
-
- Plus il y a de matériel tumoral disponible, plus le résultat sera représentatif du statut génotypique de la tumeur

 - Cas particuliers: données cliniques; échec d' une première analyse

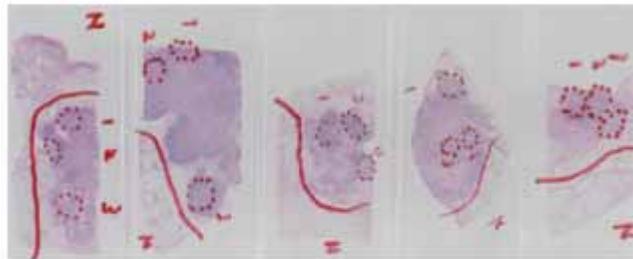
Les différents prélèvements cytologiques en vue du génotypage

- Les prélèvements cytologiques
 - LBA, LB
 - Liquides pleuraux
 - LCR
 - Cytologie d'EBUS
 - Cellules tumorales circulantes (CTC)
- Peuvent être plus rentables qu'un tissu pauvre en cellules tumorales
- Possibilité de monitoring moléculaire

- Le problème des métastases osseuses

L'hétérogénéité des mutations de l'EGFR

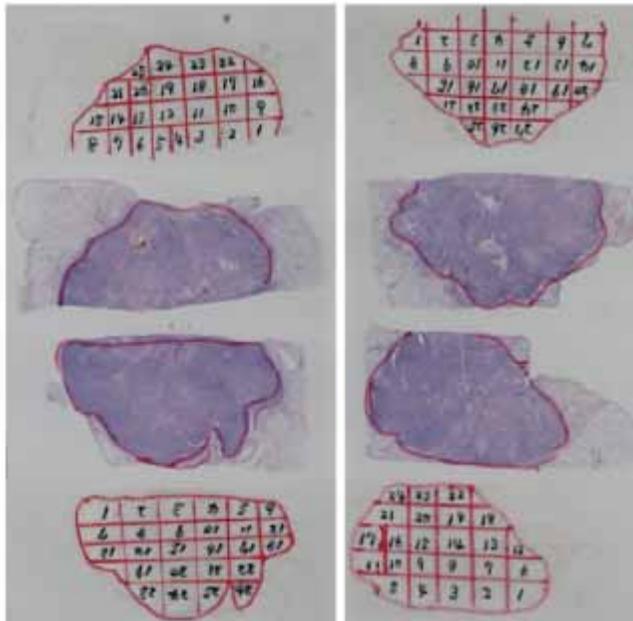
- très rare dans les adénocarcinomes bronchiques



Three small areas were selected from each of 50 ADCs carrying the *EGFR* mutation



Identical *EGFR* mutation among the three areas



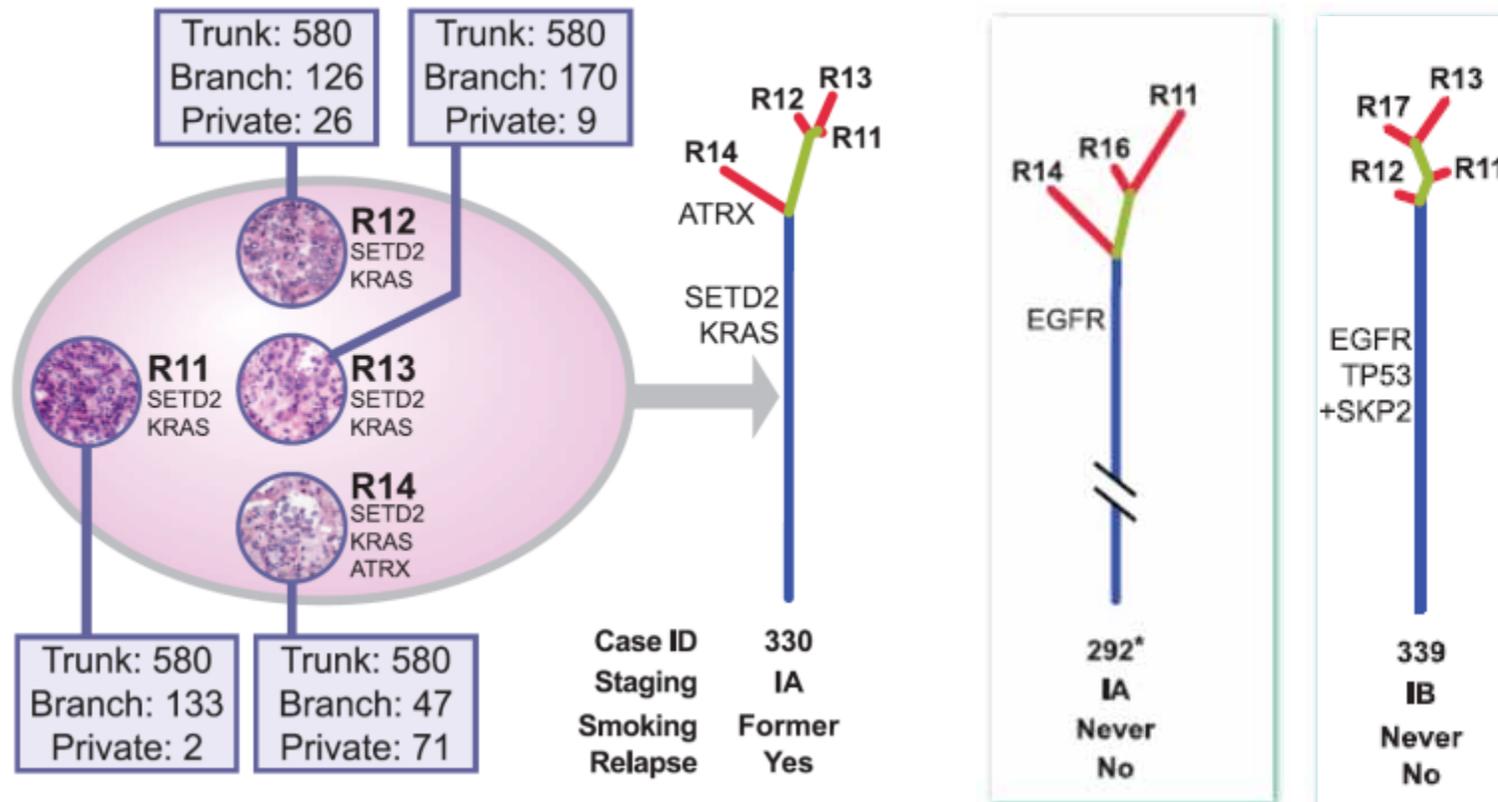
Five ADCs with the *EGFR* mutation were dissected into more than 100 pieces



Identical *EGFR* mutation among the pieces

L'hétérogénéité des mutations « driver »

➤ très rare dans les adénocarcinomes bronchiques



➤ Single-region sequencing may be adequate to identify the majority of known cancer gene mutations in localized lung adenocarcinomas

Au diagnostic: tumeur primitive *versus* métastase?

- Discordance tumeur primitive *versus* métastase
- Discordance entre les différentes métastases
- Discordance dans le temps

Au diagnostic: tumeur primitive *versus* métastase?

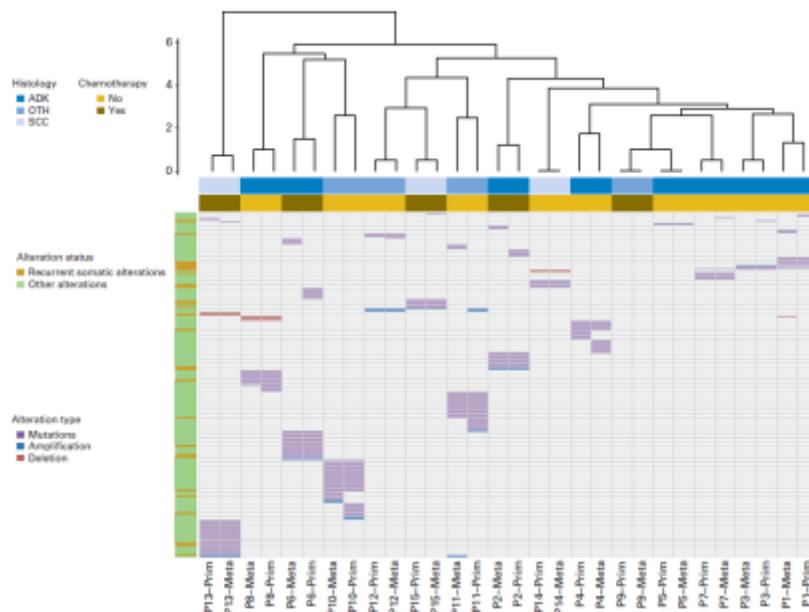
Patient	Sex	Age (years)	Smoking Status	Primary Tumor Surgery Type	Primary Tumor Histologic Type	Tumor Cellularity in Primary Tumor (%)	Chemotherapy for Early-Stage Disease	Time to Relapse (months)	Synchronous Metastasis	Metastatic Site	Tumor Cellularity in Metastasis (%)
1	M	60	Yes	Lobectomy RLL	Adenocarcinoma	80	No	3	No	Cutaneous	70
2	F	51	Yes	Lobectomy LUL	Adenocarcinoma	70	Adjuvant (cisplatin, vinorelbine)	20	No	CNS	50
3	F	52	Yes	Lobectomy RLL	Adenocarcinoma	70	No	17	No	CNS	80
4	M	48	Yes	Lobectomy RUL	Adenocarcinoma	90	No	58	No	Distant adenopathy	80
5	M	41	No	Lobectomy RLL	Adenocarcinoma	90	No	38	No	Locoregional	90
6	M	59	Yes	Lobectomy LUL	Adenocarcinoma	70	Neoadjuvant (cisplatin, vinorelbine)	0	Yes	Adrenal	60
7	M	60	Yes	Lobectomy RUL	Adenocarcinoma	70	No	57	No	Locoregional	70
8	M	68	Yes	Lobectomy RUL	Adenocarcinoma	80	No	14	No	Locoregional	90
9	M	54	Yes	Mediastinoscopy (bulky N2)	Large-cell carcinoma	70	Neoadjuvant (cisplatin, etoposide)	76	No	CNS	70
10	M	75	Yes	Lobectomy RLL	Large-cell carcinoma	90	No	6	No	Distant adenopathy	90
11	M	82	Yes	Bilobectomy RUL ML	Basaloid carcinoma	80	No	22	No	Locoregional	70
12	M	46	Yes	Lobectomy RUL	Basaloid carcinoma	60	No	9	No	Locoregional	70
13	M	46	Yes	Lobectomy ML	Squamous cell carcinoma	60	Chemotherapy at relapse* (cisplatin, vinorelbine)	12	No	Locoregional	70
14	M	48	Yes	Lobectomy LLL	Squamous cell carcinoma	80	No	0	Yes	Locoregional	80
15	M	57	Yes	Left pneumonectomy	Squamous cell carcinoma	50	Adjuvant (cisplatin, vinorelbine)	19	No	Parietal	60

n=15

NGS ciblé 189 gènes

Au diagnostic: tumeur primitive *versus* métastase?

Tumor Status	Nonsynonymous Mutations	Synonymous Mutations	Insertion Deletion	Homozygous Deletion	Amplification	Large Structural Alterations	Total
Primary	95	27	6	4	12	17	161
Metastasis	85	25	8	5	10	17	150
Total	180	52	14	9	22	34	311



Alterations	No. of Evaluated Alterations	Shared	Unshared	Concordance Rate (%)
Mutations				
Recurrent	28	26	2	93
Passenger	144	88	56	61
Large structural alterations				
Recurrent	5	5	0	100
Passenger	15	7	8	40
Global				
Recurrent	33	31	2	94
Passenger	159	95	64	63

➤ Forte concordance pour les mutations somatiques récurrentes

Au diagnostic: tumeur primitive *versus* métastase?

➤ Mutations récurrentes

Gene	cDNA Mutation	Impact on Protein Synthesis	No. in Primary Tumors	No. in Metastatic Tumors
Mutations				
<i>EGFR</i>	2582T>G	L861R	1	1
<i>GNAS</i>	601C>T	R201C	1	1
<i>KRAS</i>	34G>T	G12C	1	1
	35G>A	G12D	1	1
	37G>T	G13C	2	2
<i>NOTCH1</i>	4140delG	Frameshift	1	1
<i>PIK3CA</i>	1357G>C	E453Q	1	1
	1624G>A	E542K	1	1
	1633G>A	E545K	1	0
<i>RB1</i>	861G>T	E287D	1	1
<i>SMARCA4</i>	3169G>T	E1057*	1	1
	2506-2A>T	Splice	1	1
<i>STK11</i>	179_80insA	Frameshift	0	1
	232A>G	K78E	1	0
	488G>A	G163D	1	1
<i>TP53</i>	225delT	Frameshift	1	1
	338_375del	Frameshift	1	1
	375 + 1C>A	Splice	1	1
	406C>T	Q136*	1	1
	474CGC>TTT	R158F	1	1
	511G>T	E171*	1	1
	659A>G	Y220C	1	1
	743G>A	R248Q	1	1
	811G>A	E271K	1	1
	818G>T	R273L	2	2
939_943delAGGAG	Frameshift	1	1	
Large structural alterations				
<i>CDKN2A</i>	Deletion		1	1
<i>FGFR1</i>	Amplification		1	1
<i>MYC</i>	Amplification		1	1
<i>SOX2</i>	Amplification		2	2
Total			32	31

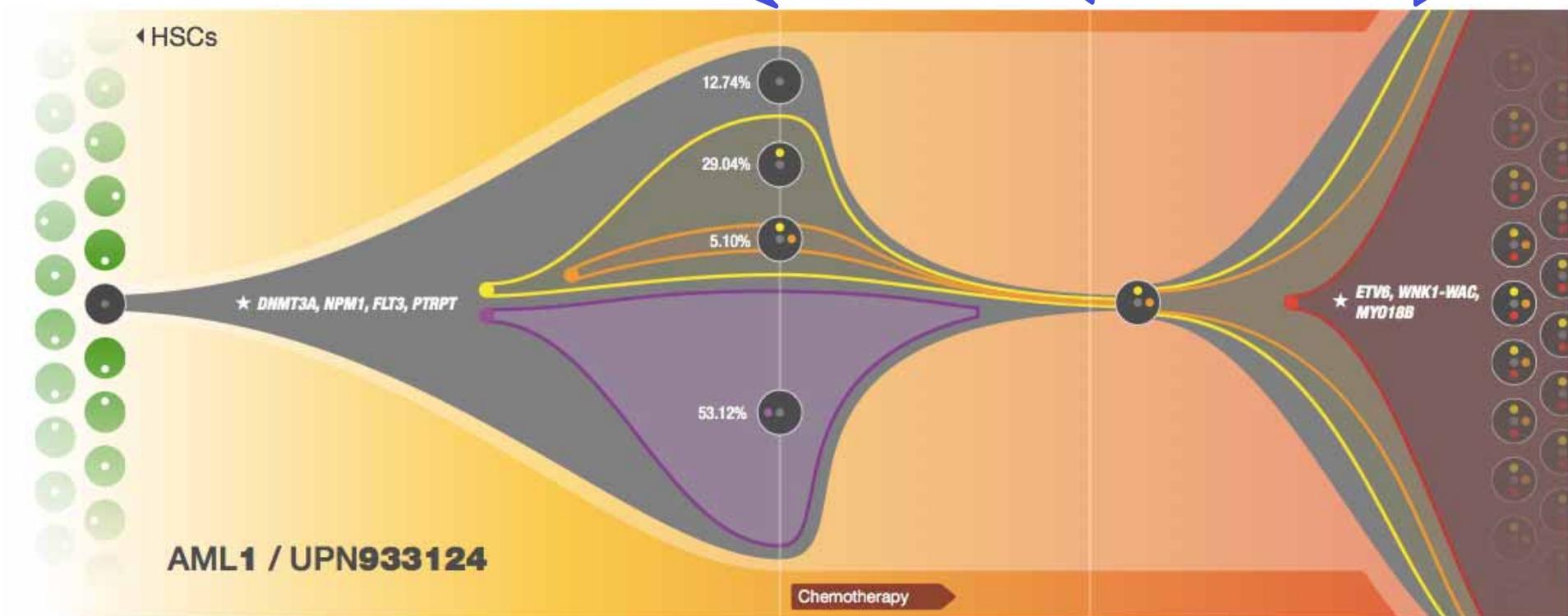
➤ Mutations passagères

A la progression, sous thérapie ciblée: la re-biopsie?

Diagnosis: Multiple leukemic clones

Clinical remission:
loss of most leukemic clones

Relapse: Acquisition of new mutations in a pre-existing clone



cell type:



mutations:

grey circle with grey dot: founder (cluster 1)

purple circle with purple dot: primary specific (cluster 2)

yellow circle with yellow dot: relapse enriched (cluster 3)

orange circle with orange dot: relapse enriched (cluster 4)

red circle with red dot: relapse specific (cluster 5)

white circle with grey dot: random mutations in HSCs

star symbol: pathogenic mutations

A la progression, sous thérapeutique ciblée: la re-biopsie?

Oui

- Sélection de clones
 - Mécanisme de résistance très divers
 - Pas de prédiction par les données cliniques ...
 - Conséquences thérapeutiques
-
- Discordance entre les différentes métastases
 - Discordance dans le temps

Mais

- Lieu de la re-biopsie
- Faisabilité de la re-biopsie

A la progression, sous thérapie ciblée: la re-biopsie?

Lieu (BATTLE Lung Trial):

- Rentabilité meilleure sur la tumeur primitive
- Plus d' échecs si antécédent de radiothérapie
- Ni la taille, ni la morphologie radiologique, ni la localisation, ni la profondeur, ni le PET-Scan n' influence le taux de succès

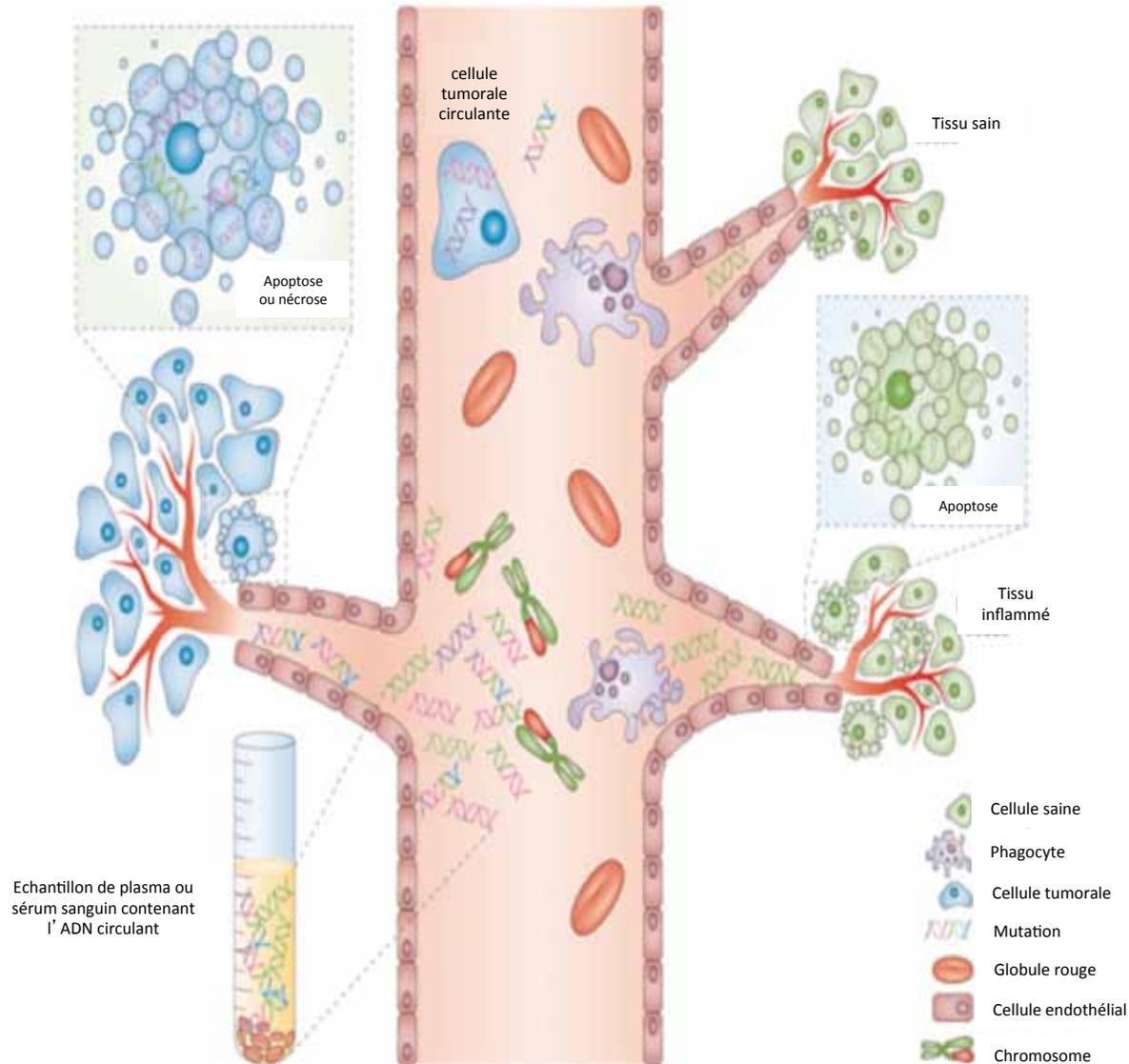
Tam AI, JTO 2013

Faisabilité

- La balance bénéfique/risque dépend du contexte: échec de génotypage au diagnostic ou à la progression
- Taux d' échec: 4-25%
- Taux de complications: <1-16%

Chouaid C, LC 2014

Les biopsies liquides



L'ADN circulant provient de la mort des cellules présentes

- dans les tissus sains
- inflammatoires
- et/ou
- malades

par apoptose, nécrose ou relargage

Les biopsies liquides: ADN tumoral circulant



- ADN libre circulant (cfDNA)
 - Concentrations plus élevées en cas de cancer
 - ADN tumoral circulant (ctDNA)
 - Concentrations plus élevées dans les stades avancés
 - Taille entre 150-500 bp
 - Faible fraction des cfDNA (10^{-0,01}%)
-
- Distinguer ctDNA du cfDNA: 10 à 0,01%
 - Importance du pré-analytique: délais, double centrifugation
 - Techniques de biologie moléculaire spécifiques et sensibles

Les biopsies liquides: ADN tumoral circulant

Sensibilité, spécificité



Étude IFUM

- phase IV, prospective, multicentrique
- kit TheraScreen®
- n = 652

	Plasma 1 <i>EGFR</i> Mutation Status, <i>n</i>		Total
	Positive	Negative	
Tumor <i>EGFR</i> mutation status, <i>n</i> ^a			
Positive	69	36	105
Negative	1	546	547
Total	70	582	652
	<i>n</i>	Rate, %	95% Confidence Interval
Concordance	652	94.3	92.3–96.0
Sensitivity	105	65.7	55.8–74.7
Specificity	547	99.8	99.0–100.0
Positive-predictive value	70	98.6	92.3–100.0
Negative-predictive value	582	93.8	91.5–95.6



Les biopsies liquides: ADN tumoral circulant

n = 107 plasma CBNPC non-fumeurs
NGS ciblé

		<i>n</i>	cfDNA concentration Median ± IQR (in ng/mL)	<i>P</i>	Spearman rho	<i>P</i> _{correlation}
Histology	Non-adenocarcinoma	15	50.2 ± 71.0	0.580 ^a	+0.054	0.583
	Adenocarcinoma	91	68.4 ± 126.7			
Tumor "T" stage	T1	18	42.4 ± 152.1	0.195 ^b	+0.057	0.578
	T2	36	70.4 ± 119.8			
	T3	16	40.7 ± 33.9			
	T4	29	81.0 ± 130.5			
	Missing (Tx)	7				
Node "N" stage	N0	29	70.0 ± 123.0	0.536 ^b	−0.014	0.895
	N1	10	114.6 ± 339.8			
	N2	37	49.1 ± 52.0			
	N3	21	124.3 ± 187.7			
	Missing (Nx)	9				
Metastatic "M" stage	M0	27	34.7 ± 25.0	0.001 ^a	+0.313	0.001
	M1	78	92.3 ± 128.0			
	Missing	1				
Number of metastatic sites	0	27	34.7 ± 25.0	0.003 ^b	+0.322	0.001
	1	33	69.7 ± 146.1			
	2+	44	103.0 ± 117.8			
	Missing	2				
TNM stage	Stage I–II	13	32.6 ± 170.9	0.002 ^b	+0.327	0.001
	Stage III	13	34.7 ± 24.0			
	Stage IV	78	92.3 ± 127.9			
	Missing	2				
Overall		106	67.1 ± 122.1	–	–	–



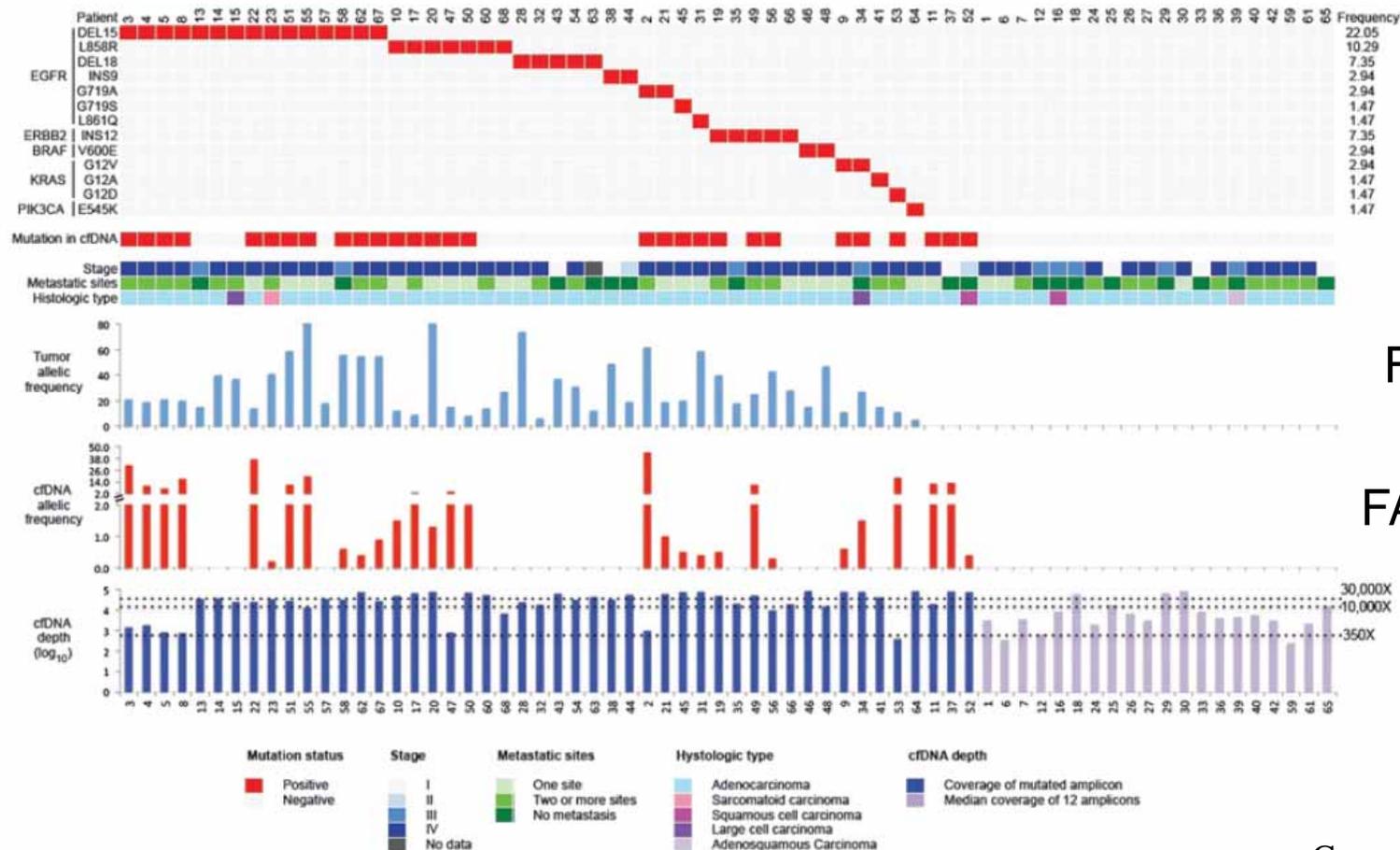
Les biopsies liquides: ADN tumoral circulant

n = 68 CBNPC non-fumeurs avec tumeur/plasma

NGS ciblé

Sensibilité: 58% (95% IC, 43%-71%)

Spécificité: 87% (95% IC, 62%-96%)



FA 20%

FA 0,2-44%

Les biopsies liquides: ADN tumoral circulant



EMEA-CHMP- 26 septembre 2014

« Lorsque l'utilisation d'IRESSA est envisagée en tant que traitement du CBNPC localement avancé ou métastatique, il est important que la mutation de l'EGFR à partir du tissu tumoral soit recherchée pour tous les patients.

Si un échantillon de la tumeur n'est pas analysable, de l'ADN tumoral circulant (ADNct) obtenu à partir d'un échantillon de sang (plasma) peut alors être utilisé.

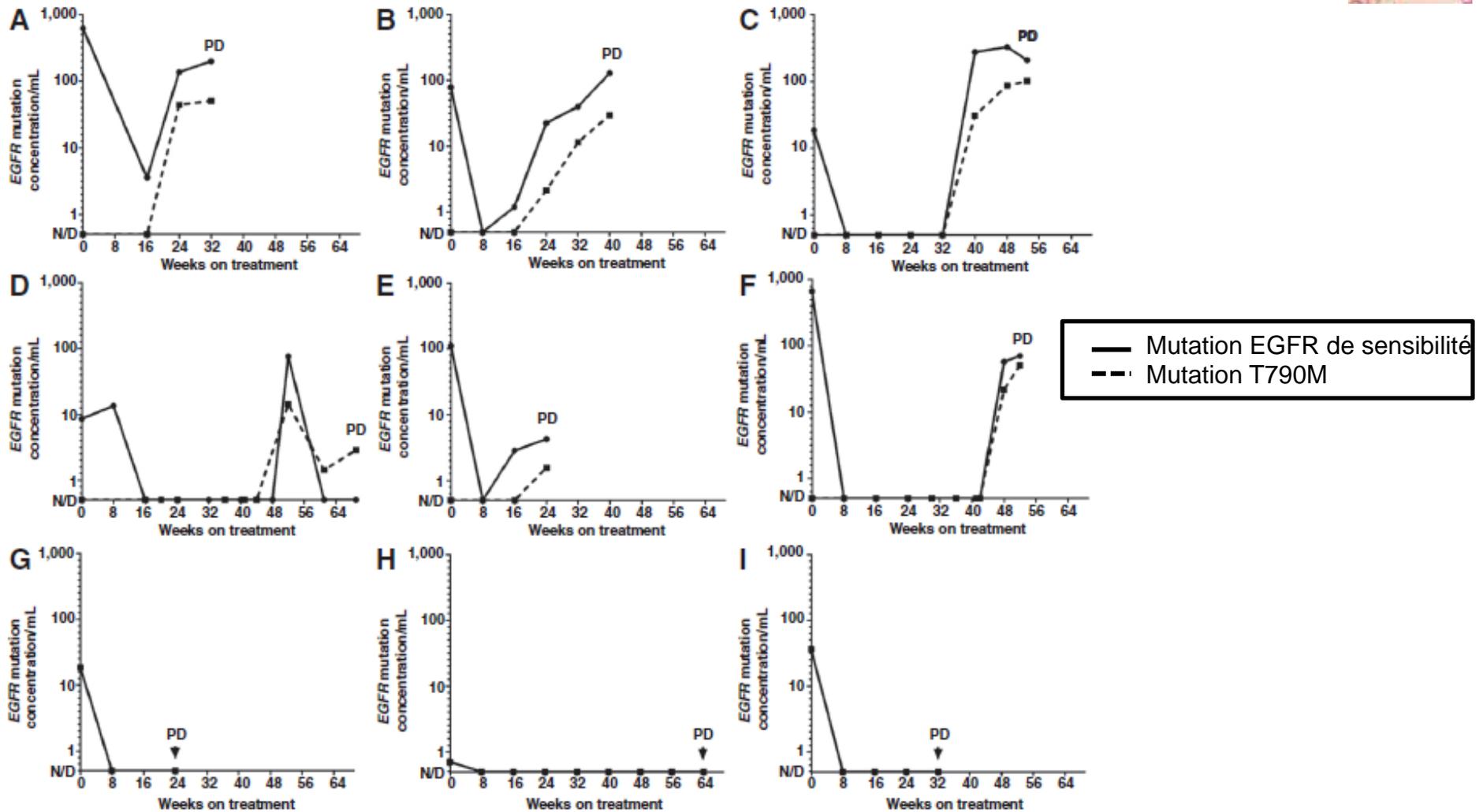
Seul(s) un/des test(s) robuste(s), fiable(s) et sensible(s), ayant démontré son/leur habilité à déterminer le statut de la mutation de l'EGFR au sein la tumeur ou de l'ADNct, doivent être utilisés pour éviter les déterminations de faux négatifs ou de faux positifs » (RCP IRESSA®, sections 4.4 Mises en garde & Précautions d'emploi et 5.1 Propriétés pharmacologiques) ».

➤ Déterminer le profil moléculaire



Les biopsies liquides: ADN tumoral circulant

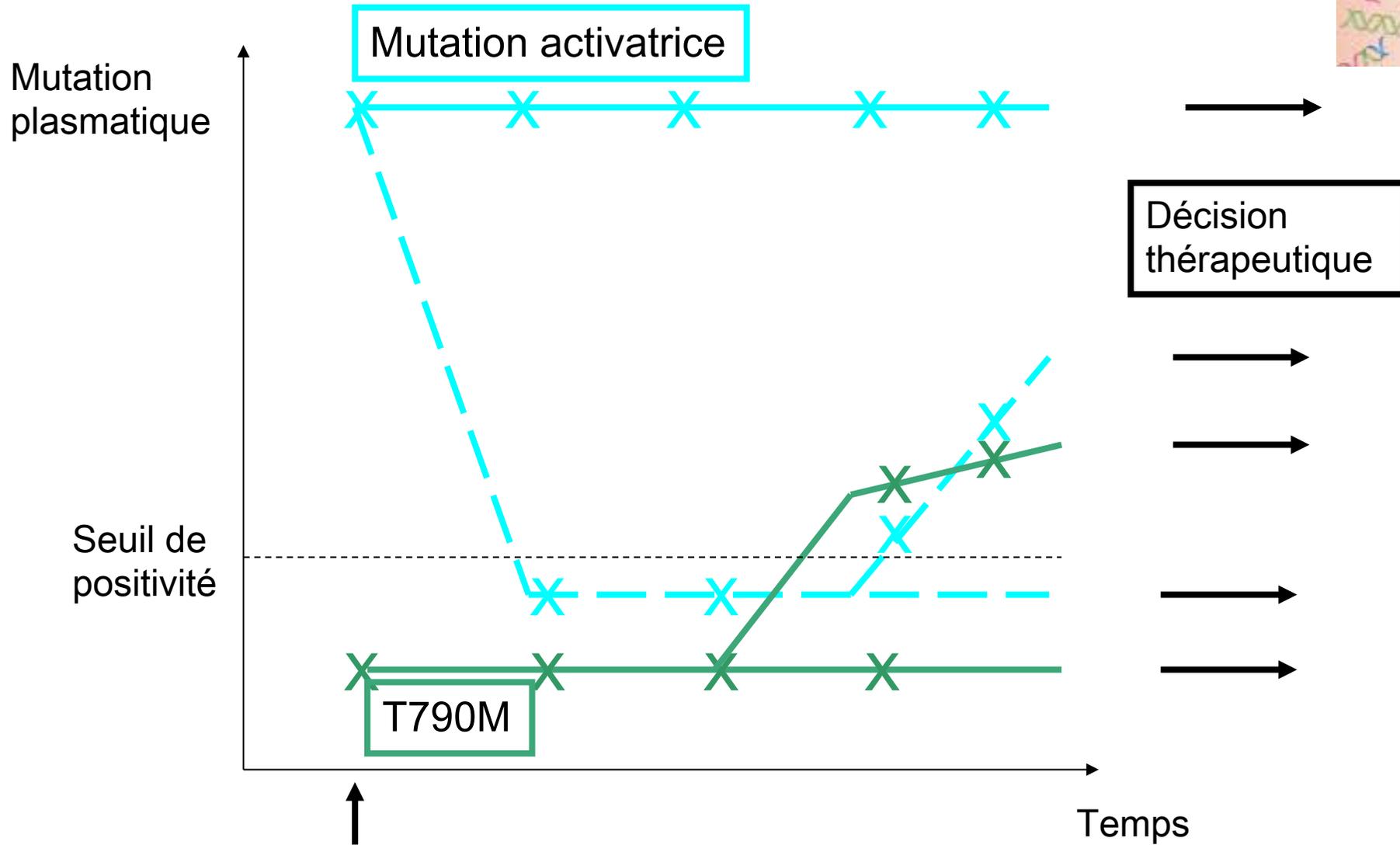
PCR digitale



➤ Monitoring moléculaire

Les biopsies liquides: ADN tumoral circulant

Quel échantillon analyser ?



↑
Diagnostic
Traitement par ITK-EGFR

Les biopsies liquides: ADN tumoral circulant

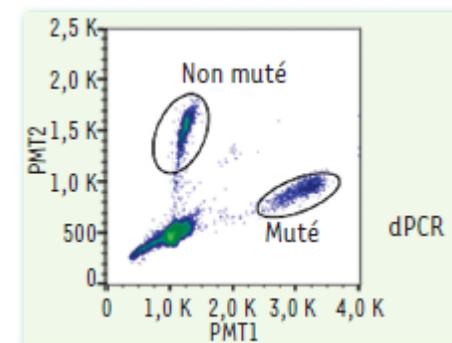
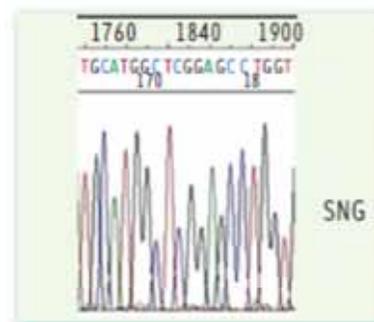
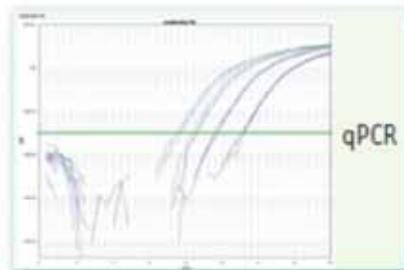


- Recherche de mutation quand prélèvement tissulaire non disponible
 - Bloc épuisé
 - Prélèvement disponible mais pauvre en cellules tumorales
 - Mauvaise qualité d'ADN(fixation, os ...)
 - Prélèvement tissulaire non réalisable
- Suivi efficacité traitement
 - Disparition de la mutation activatrice
- Détection précoce des progressions
 - Réapparition de la mutation activatrice
 - Apparition de mutation de résistance (T790M)

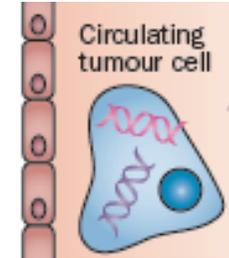


Les biopsies liquides: ADN tumoral circulant

	Innovation	Impact thérapeutique
Pronostic	-	-
Analyse moléculaire	-	+
Anticiper la résistance	+/-	+++



Les biopsies liquides: les cellules tumorales circulantes

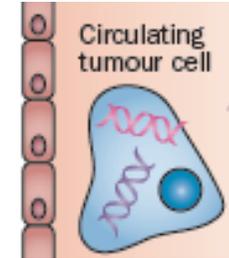


- Etape d'enrichissement
 - Critères immunologiques: Cell Search®
 - Critères morphologiques: ISET®

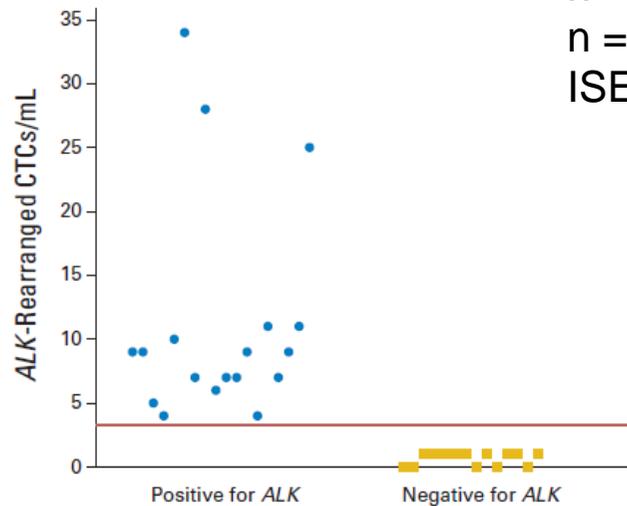
- Etape de détection
 - Translocation ALK
 - Nombre de copies de gènes
 - Recherche de mutations

- Détection de mutations et de translocations
- Faible sensibilité

Les biopsies liquides: les cellules tumorales circulantes



Translocation ALK



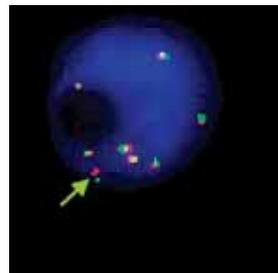
n = 18 ALK+
n = 14 ALK-
ISET® + FISH

Mutation EGFR

n = 41
n = 9 mutés EGFR
Cell Search® + qPCR

ALK-Rearranged CTCs	ALK Status in Tumor Samples		Total	NPV = 100%	PPV = 100%
	Patients				
	Positive for ALK	Negative for ALK			
< 4	0	14	14		
≥ 4	18	0	18		
Total	18	14	32		

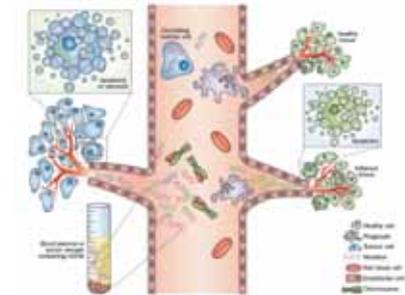
Sensitivity = 100% Specificity = 100%



Patient	EGFR			
	Tumor	Plasma D0	Plasma on-study	CTC D0
1	Mutation	Mutation	Mutation	Mutation
2	Mutation	Mutation	WT	WT
3	Mutation	Mutation	WT	WT
4	Mutation	Mutation	WT	WT
5	Mutation	N/A	N/A	N/A
6	Mutation	N/A	N/A	WT
7	Mutation	N/A	N/A	WT
8	Mutation	N/A	N/A	WT
9	Mutation	N/A	N/A	WT

Sensibilité < 40%
Spécificité » 100%

Les biopsies liquides: ctDNA *versus* CTC



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

- Introduction
- Quel échantillon analyser?
- **Quels critères de qualité de l'échantillon?**
- Les techniques de biologie moléculaire
- Le futur proche
- La recherche des translocations
- L'interprétation des résultats

La cellularité tumorale

- Indispensable à l'interprétation des résultats de génotypage
- Augmentée par macro- ou micro-dissection

Specimen	Total No.	DNA Concentration, ng/ μ L				P	Cell Numbers				P	Tumor Percentage				P	
		Mean [Median]	No. (%)				Mean [Median]	No. (%)				Mean [Median]	No. (%)				
			≤ 25	26-50	>50			≤ 30	31-50	51-100			>100	$\leq 30\%$	31%-50%		>50%
Smear slides	60	159.5 [89.4]	10 (16.7)	10 (16.7)	40 (66.7)	0 ^a	411.9 [300]	7 (11.7)	7 (11.7)	5 (8.3)	41 (68.3)	0 ^a	66.5 [70]	4 (6.7)	6 (10)	50 (83.3)	0 ^a
FNA	38		3 (7.9)	9 (23.7)	26 (68.4)	.019 ^b		0 (0)	7 (18.4)	3 (7.9)	28 (73.7)	.001 ^b		1 (2.6)	5 (13.2)	32 (84.2)	.167 ^b
Pleural fluid	16		5 (31.3)	0 (0)	11 (68.8)			5 (31.3)	0 (0)	1 (6.3)	10 (62.5)			1 (6.3)	1 (6.3)	14 (87.5)	
Others	6		2 (33.3)	1 (16.7)	3 (50)			2 (33.3)	0 (0)	1 (16.7)	3 (50)			2 (33.3)	0 (0)	4 (66.7)	
Cell blocks	43	59.6 [40.7]	13 (30.2)	14 (32.6)	16 (37.2)		231.9 [90]	11 (25.6)	6 (14)	7 (16.3)	19 (44.2)		48.3 [50]	10 (23.3)	12 (27.9)	12 (27.9)	
FNA	30		5 (16.7)	12 (40)	13 (43.3)	.013 ^b		5 (16.7)	3 (10)	6 (20)	16 (53.3)	.075 ^b		5 (16.7)	7 (23.3)	18 (60)	.077 ^b
Pleural fluid	11		6 (54.5)	2 (18.2)	3 (27.3)			6 (54.5)	1 (9.1)	1 (9.1)	3 (27.3)			4 (36.4)	4 (36.4)	3 (27.3)	
Others	2		2 (100)	0 (0)	0 (0)			0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)			1 (50)	1 (50)	0 (0)	

Sun PL, Cancer Cytopathol 2013

- Seuil minimal à déterminer selon les techniques de biologie moléculaire utilisées

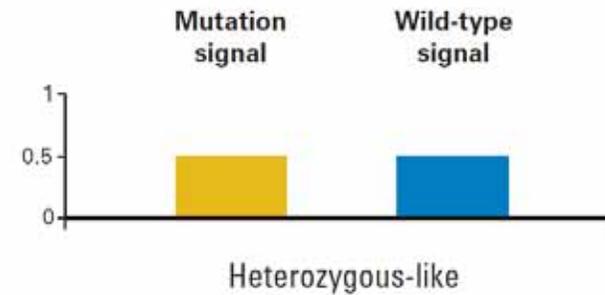
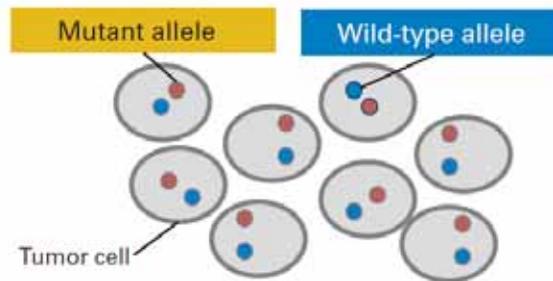
Seuil de sensibilité d'une technique de biologie moléculaire

- Plus faible concentration de cellules tumorales dans laquelle la mutation est encore détectée avec une reproductibilité de 100% à la fois en intra-run et en inter-run
- Peut aussi être définie à partir de population de cellules mutées /ou ADN muté dilué avec des cellules non mutée/ou ADN wild-type

L'amplification du gène

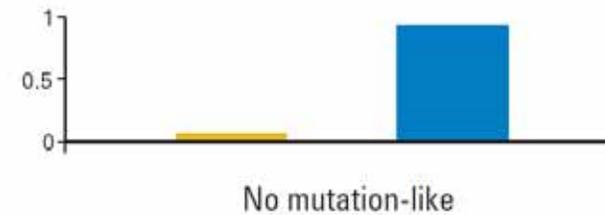
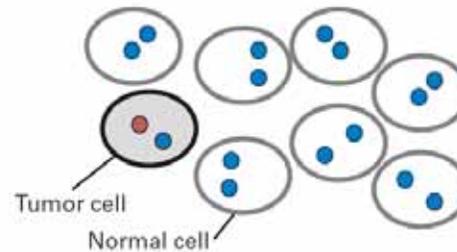
A

Periphery
EGFR mutation
w/o amplification



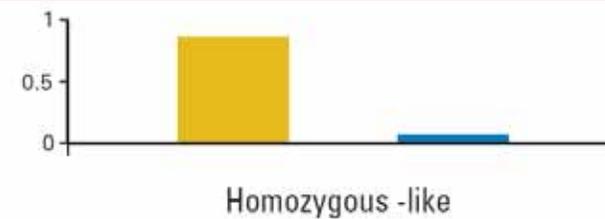
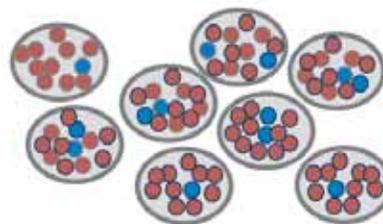
B

Periphery
EGFR mutation
w/o amplification
Mixed with normal cells



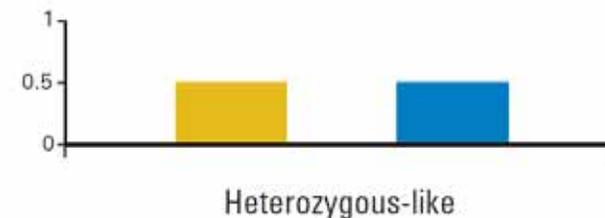
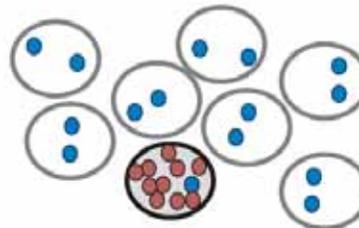
C

Center
EGFR mutation
w/ amplification



D

Center
EGFR mutation
w/ amplification
Mixed with normal cells



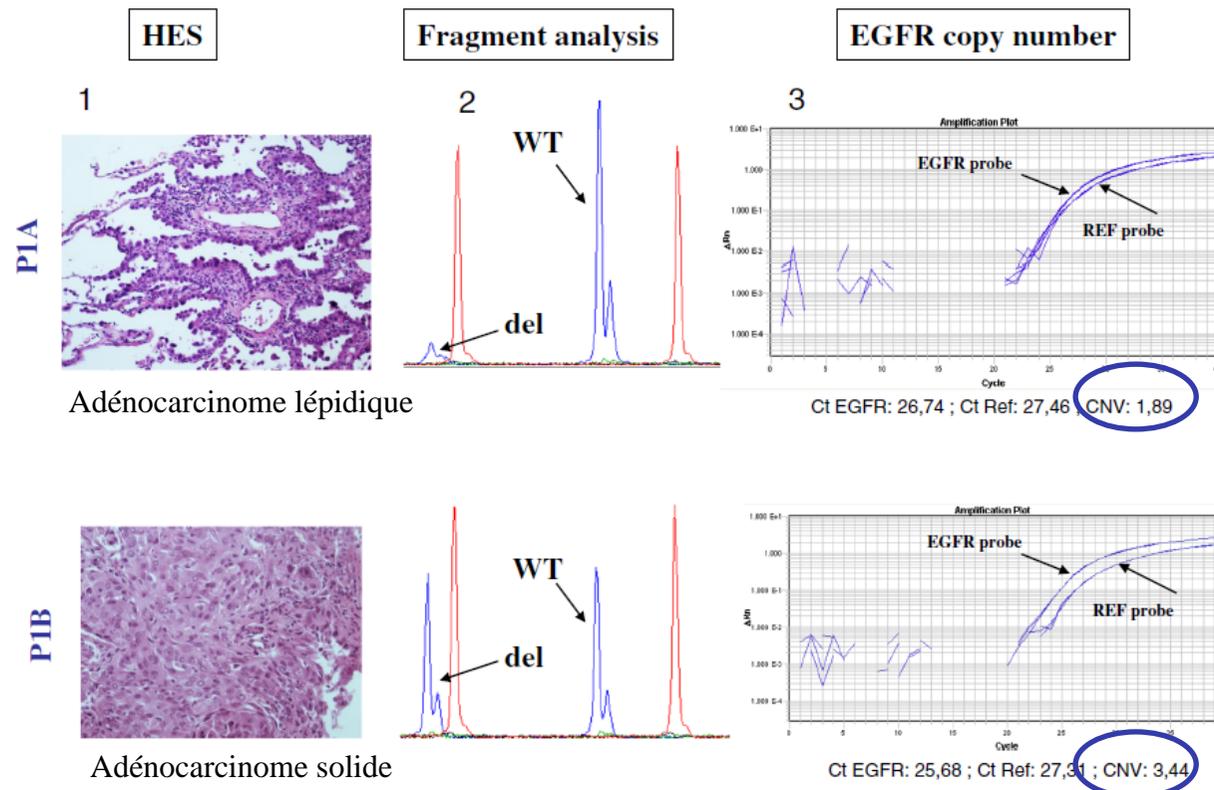
L'amplification du gène

Etude rétrospective, 153 fragments tumeurs mutées EGFR et 39 wild-type

Analyse de fragment; QPCR Taqman

-Bonne concordance tumeur primitive/métastase

-50%: CNV différent



Durée et type de fixation / qualité de l'ADN

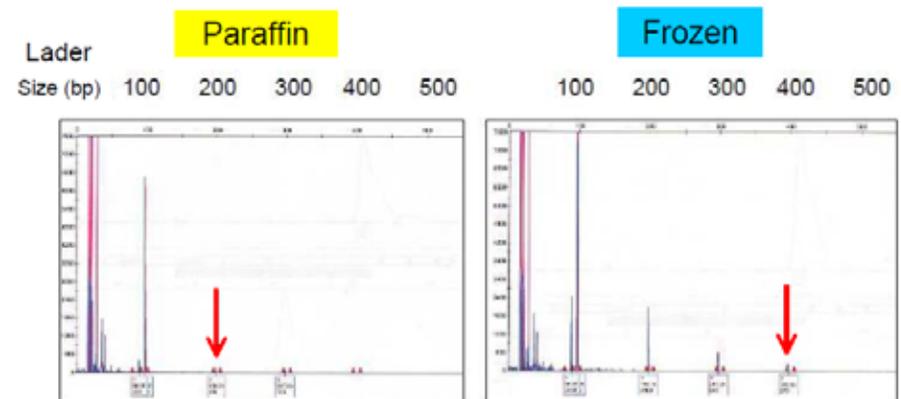
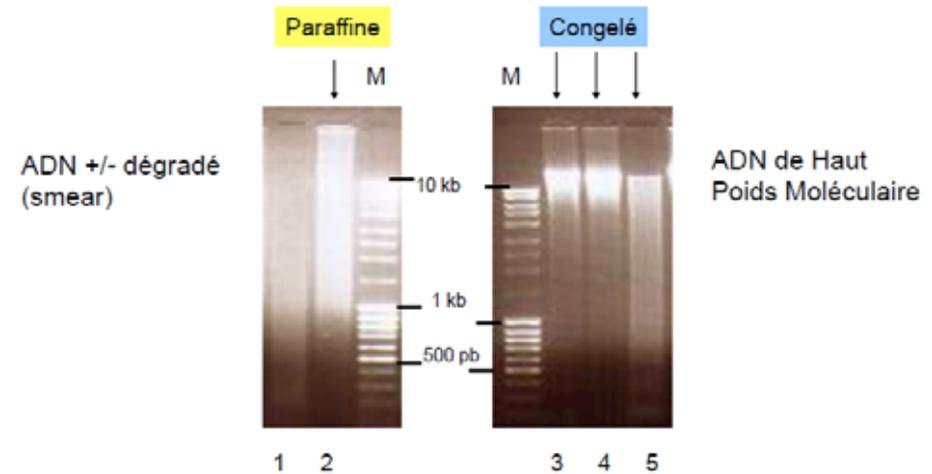
Etude IFCT/ERMETIC

- Durée de fixation
 - Biopsies bronchiques: 6-12 heures
 - Pièces opératoires: 8-18 heures
 - Age des blocs < 5ans
 - Type de fixation
 - Formol
 - *AFA*
 - Bouin
 - Fixateur à base de métaux lourds/décalcification
- Tous les échantillons inclus en paraffine (FFPE) peuvent être utilisés même si le gold standard reste le tissu frais ou le tissu congelé

Qualité/quantité de l'ADN

Qualité de l'ADN

- Fragmentation
- Amplification



Quantité d'ADN

- Quantité minimale requise ?

- Introduction
- Quel échantillon analyser?
- Quels critères de qualité de l' échantillon?
- **Les techniques de biologie moléculaire**
- Le futur proche
- La recherche des translocations
- L' interprétation des résultats

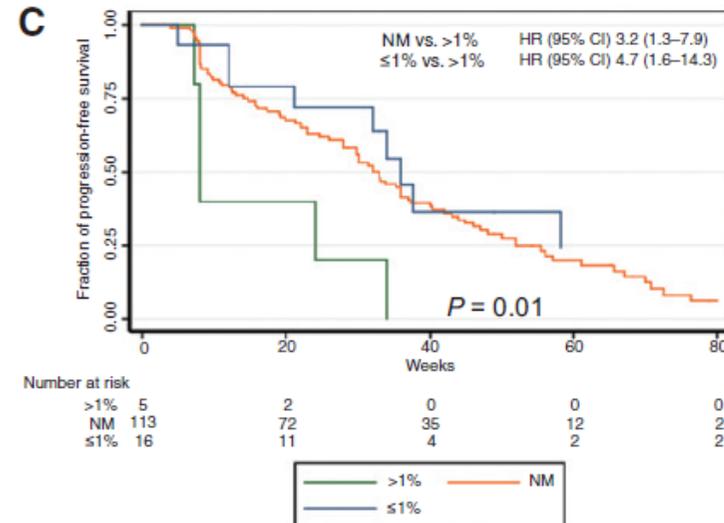
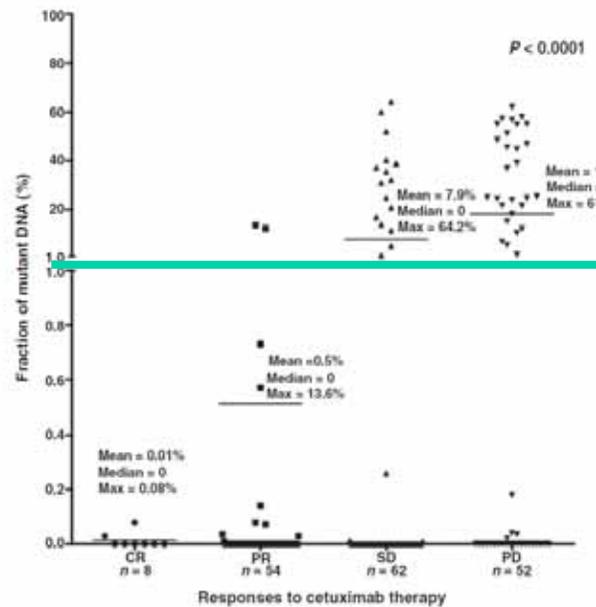
La technique la plus sensible possible ?

Oui
Mais

Quelle valeur prédictive/pronostique pour des sous-clones mutés?

Exemple du CRC

PCR digitale pour la détection des mutations KRAS



La technique la plus sensible possible ?

Exemple du CBNPC ERMETIC2

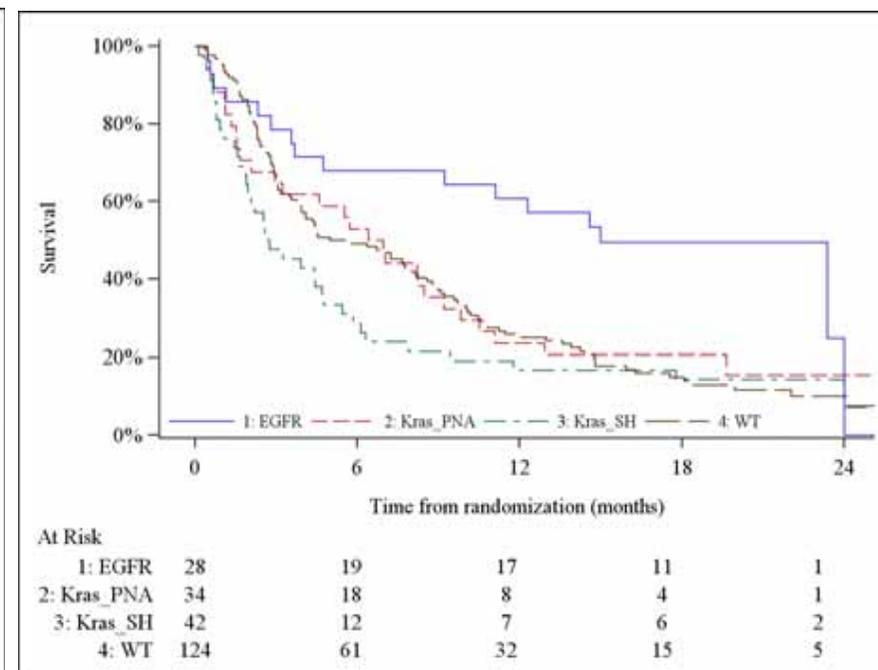
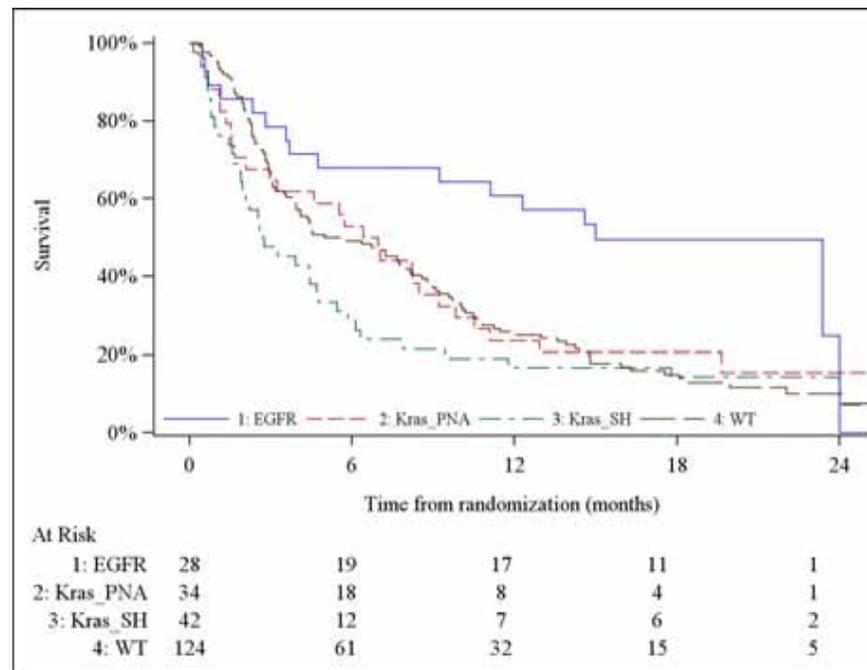
Ré-analyse par techniques alternatives au séquençage de 421 échantillons de la cohorte prospective par des techniques alternatives

Technique	<i>EGFR</i>	<i>EGFR NA</i>	<i>KRas</i>	<i>KRas NA</i>
Direct sequencing	44	55	44	55
Alternative techniques	42	3-53	89	2-43

- Pas de différence significative pour les mutations d 'EGFR
- Doublement du nombre de mutations KRAS
- Quelle valeur pronostique?

La technique la plus sensible possible ?

Exemple du CBNPC ERMETIC2



..... KRAS_SH detected by hybridization probes without clamped PCR

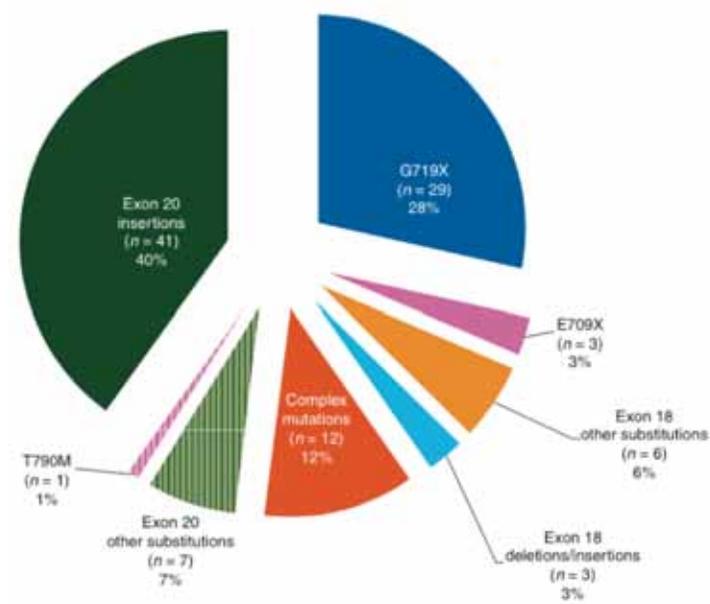
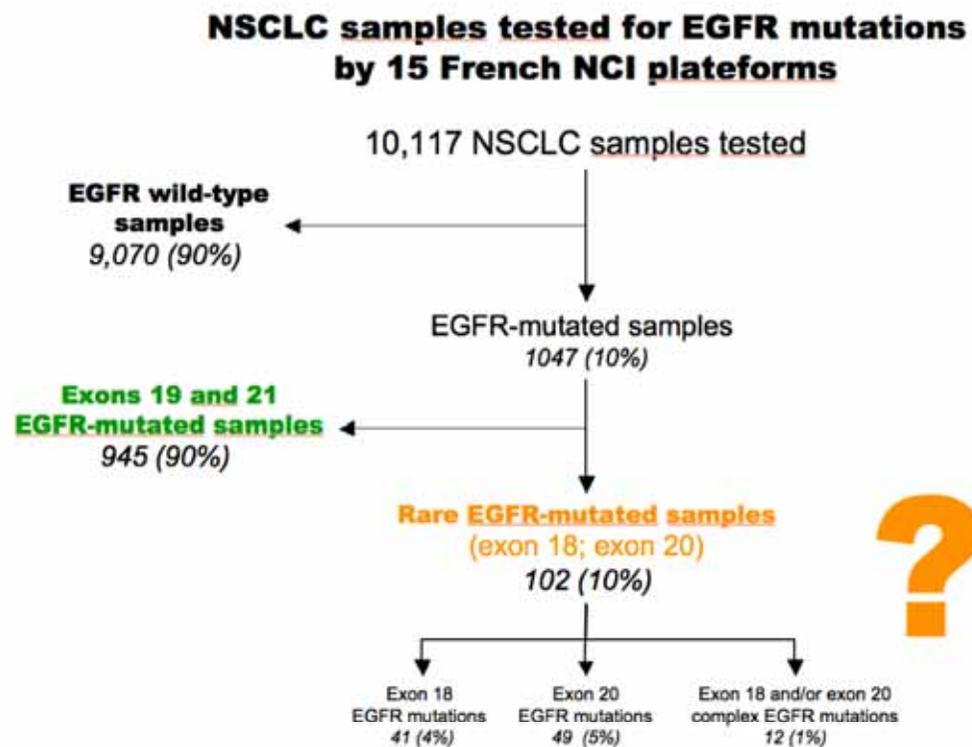
..... KRAS_SH detected by hybridization probes with clamped PCR

➤ Pas de valeur pronostique des sous-clones mutés KRAS

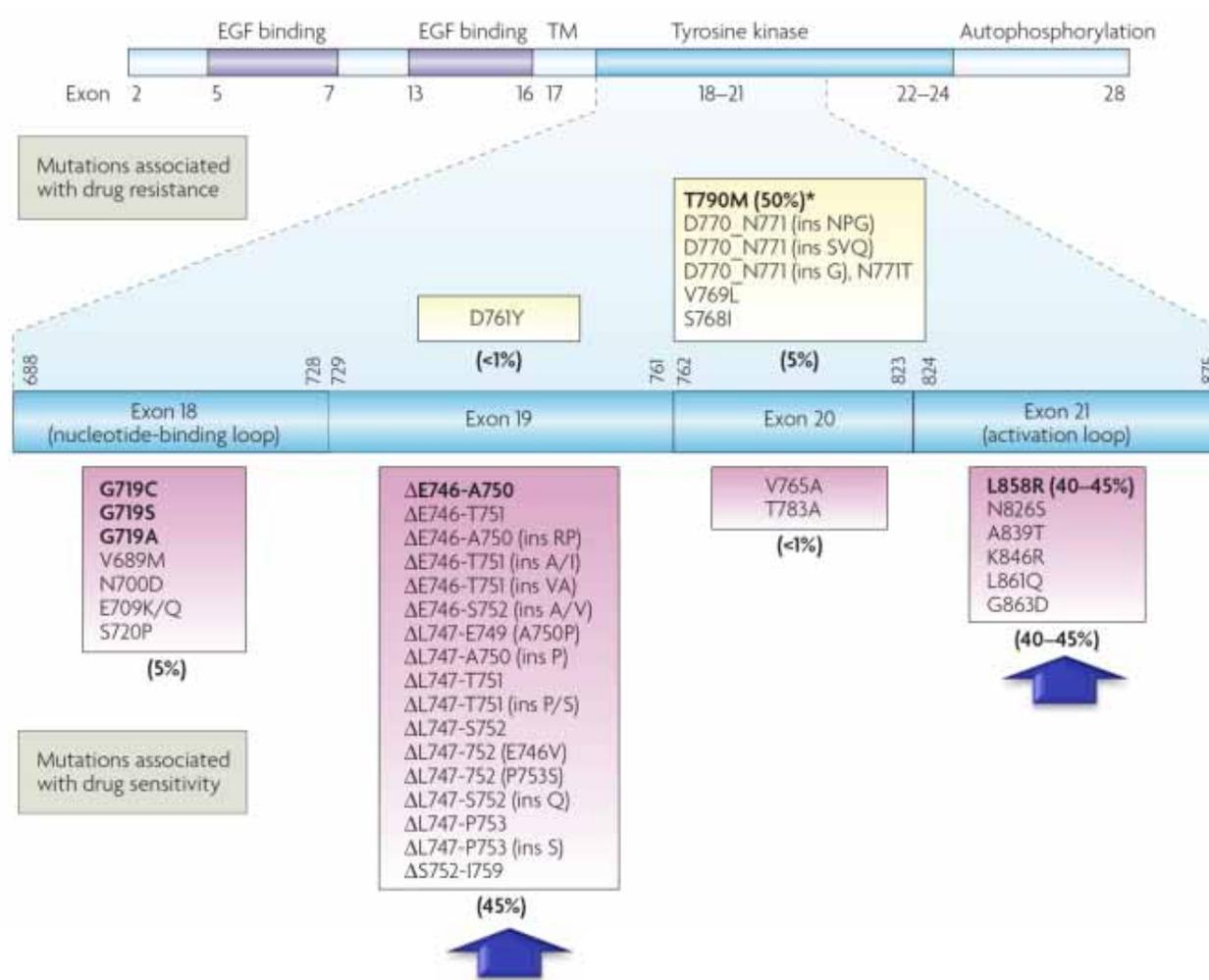
La / Les techniques les plus exhaustives possibles?

- Mutations communes de l' EGFR: Dél Exon 19 & L858R exon 21
- Mutations non communes/rares de l' EGFR:
 - exon 18 (G719X)
 - exon 20 (S768I)
 - exon 21 (L861Q)
- Insertions exon 20 ?
- Insertions exon 19 ?
- Type de délétions de l' exon 19?
- T790M
- Mutations complexes?

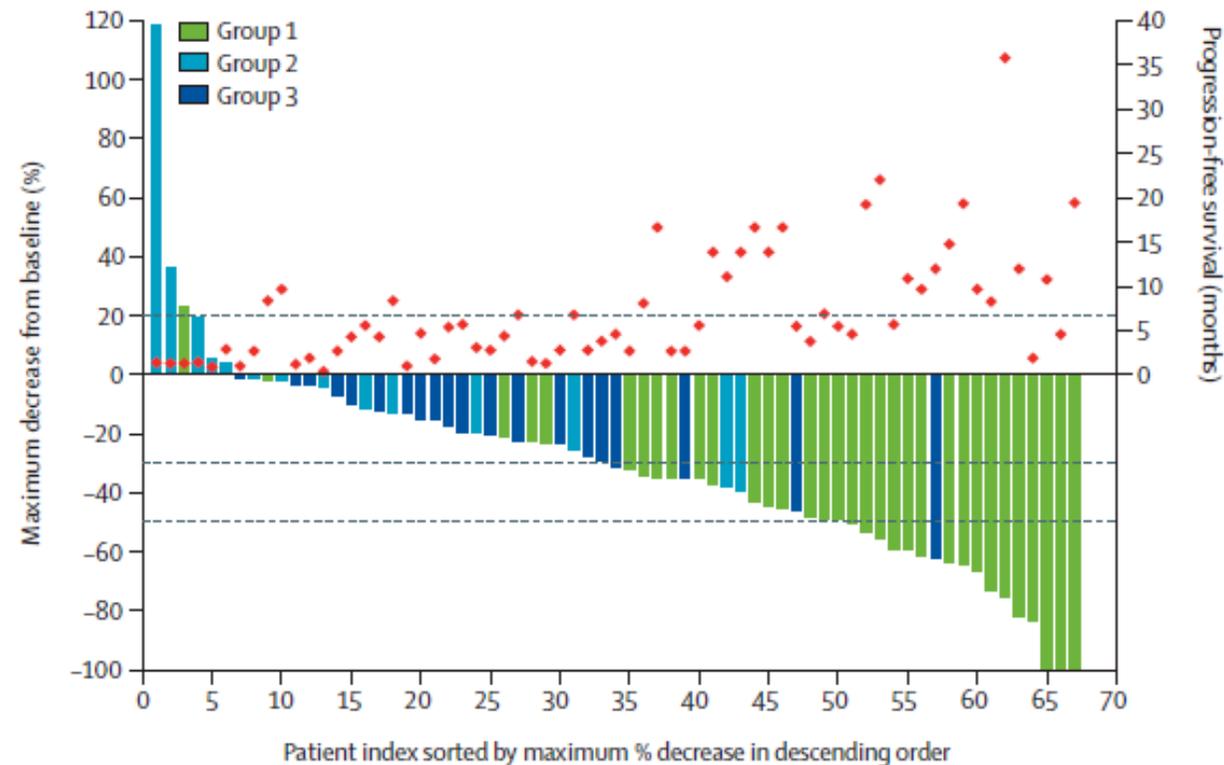
Les mutations rares, non-communes, d' EGFR



Les mutations de l'EGFR n'ont pas toutes la même valeur prédictive



Les mutations de l'EGFR n'ont pas toutes la même valeur prédictive



Group 1 (n=33): Point mutations or duplications in exons 18-21

L861Q, G719X, G719X+S768I, G719X+L861Q, E709G or V+L858R, S768I+L858R, S768I, L861P, P848L, R776H+L858R, L861Q+Del19, K739_1744dup6

Group 2 (n=14): de novo T790M mutations

T790M alone, T790M+Del19, T790M+L858R, T790M+G719X, T790M+L858R+G719X

Group 3 (n=20): Exon 20 insertions

Les méthodes génomiques

Méthode de détection	Sensibilité	Adaptée à ce type d'échantillon
Séquençage par la méthode Sanger	> 10 %	Tissu tumoral
Pyroséquençage	5-10 %	Tissu tumoral
<i>High resolution melting</i> (HRM)	5 %	Tissu tumoral
Séquençage nouvelle génération	2 %	Tissu tumoral
qPCR en temps réel*	1-10 %	Tissu tumoral
BEAMing, PCR digitale	< 0,01 %	ADN tumoral circulant, variants rares dans le tissu tumoral



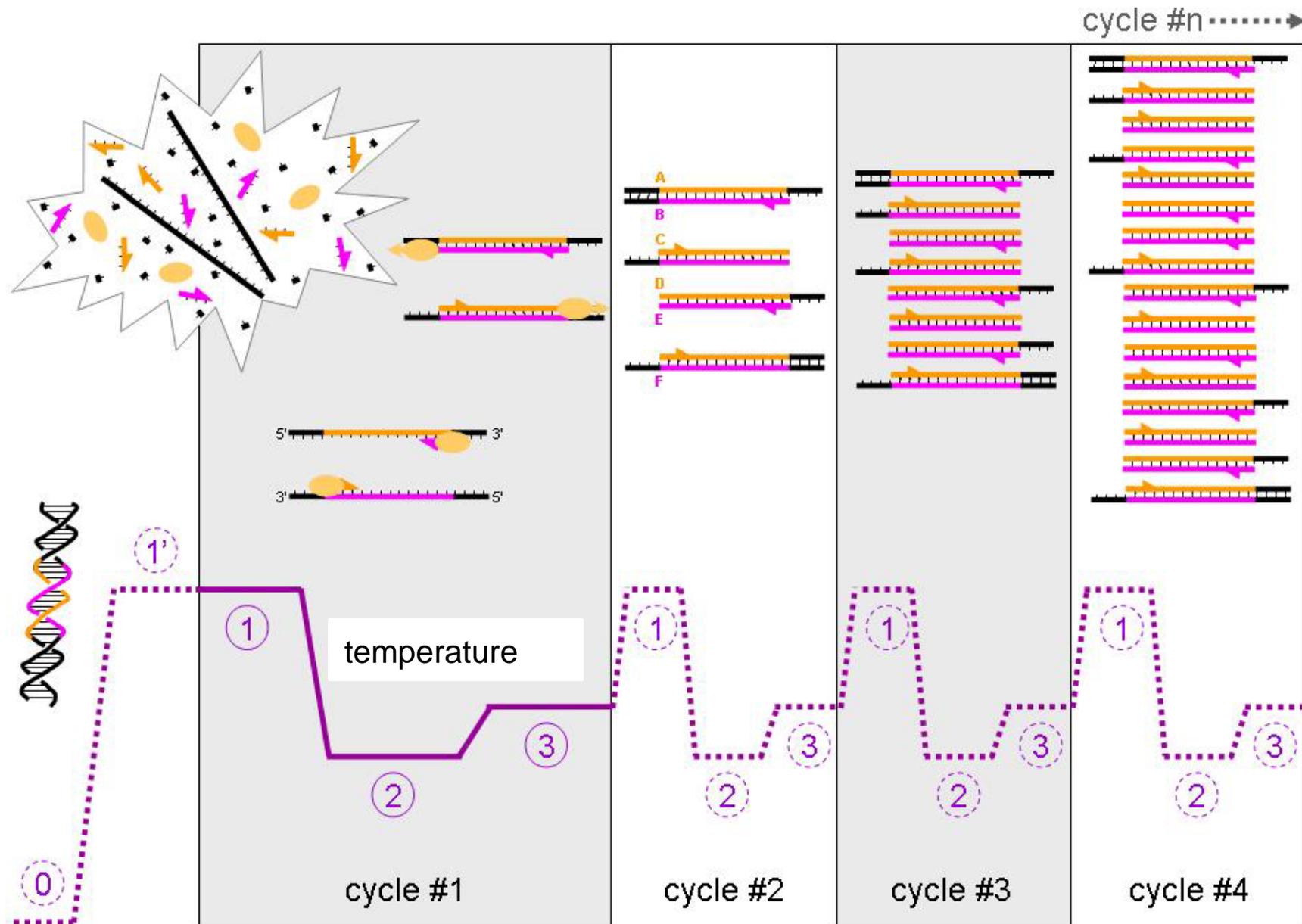
Choix de la technique: compromis entre

- Sensibilité, type d' échantillon à analyser
- Coût
- Disponibilité de l' équipement, accréditation

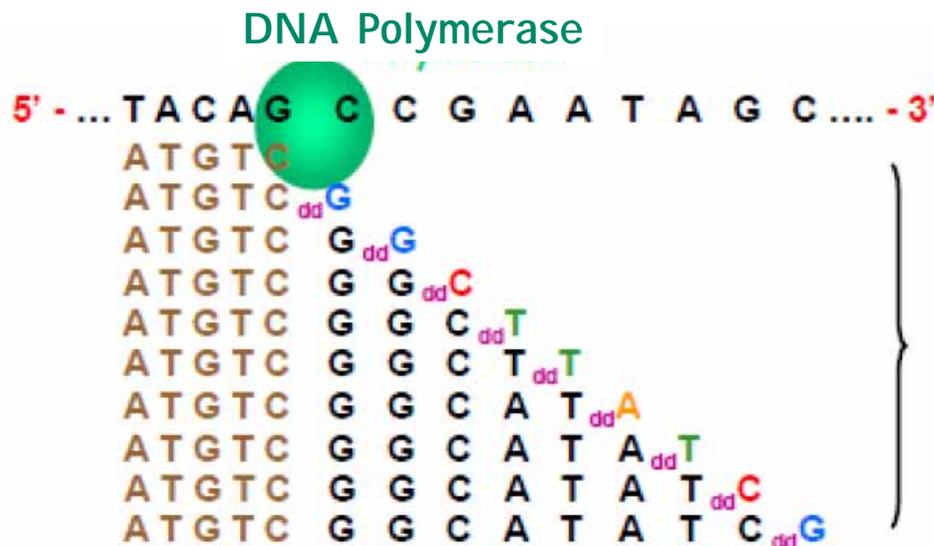
Les méthodes génomiques

	Techniques	Avantages	Inconvénients
Techniques sans a priori	Séquençage Sanger HRM Pyroséquençage NGS	Exhaustive	Longue Sensibilité
Techniques ciblées	(Pyroséquençage) Amplification allèle-spécifique Snap-shot Analyse de fragment	Rapidité Sensibilité	Non exhaustive Coût

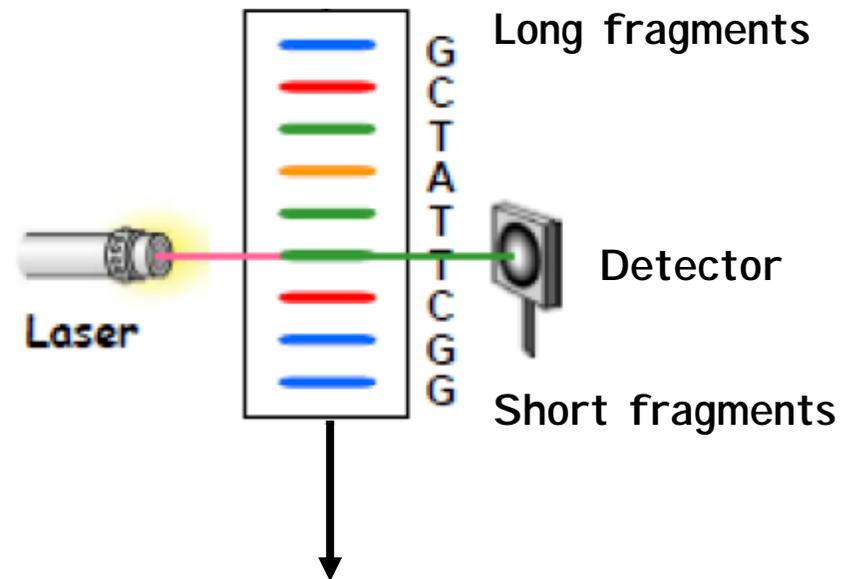
La PCR, une amplification exponentielle



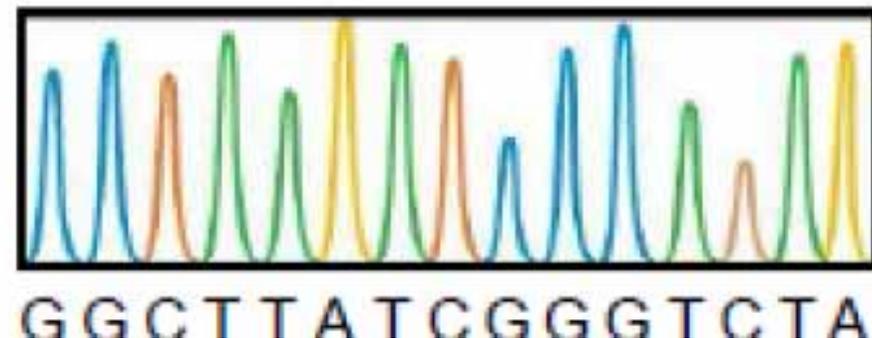
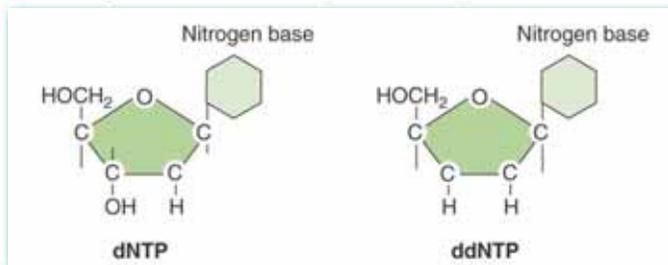
Le séquençage Sanger, principe des ddNTP



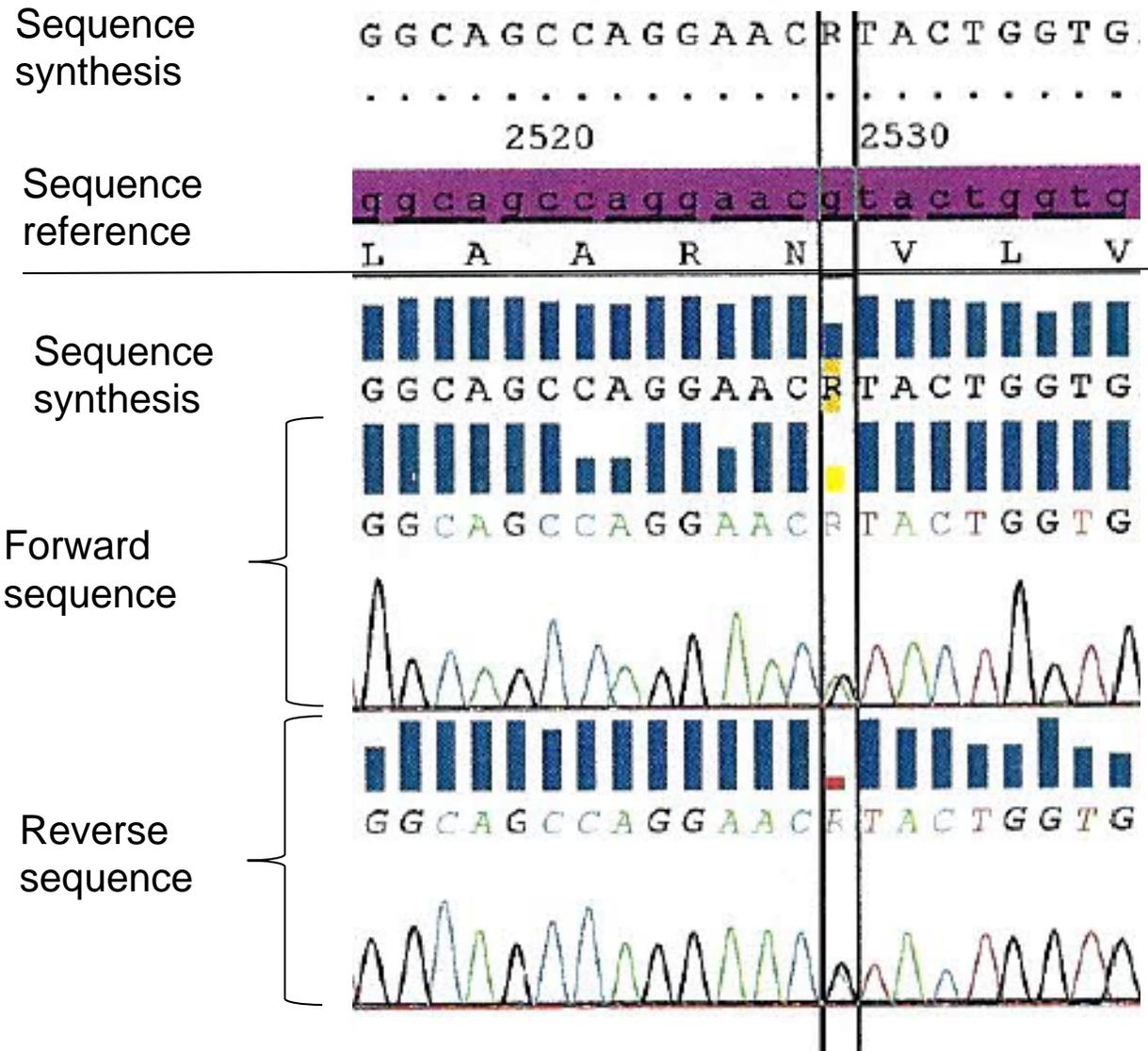
Electrophoresis



Principe: mélange de nucléotides (dNTP)
+ didésoxynTP (dd) marqués chacun par un
fluorochrome différent:
arrêt de l'élongation à chaque incorporation de
ddNTP



Le séquençage Sanger, l'alignement des séquences



(R= T+G)
c.2527G>R

p.Val843Ileu
V843I

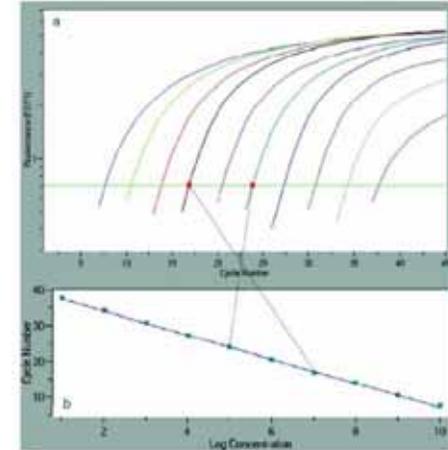
Les méthodes génomiques Non ciblées

Méthodes	Types de variants détectés	Avantages	Inconvénients	Sensibilité
Non ciblée				
Séquençage par la méthode Sanger	M	Exhaustive	Durée de la technique Sensibilité	> 20 %
HRM	M	Exhaustive	Nombreuses étapes Sensibilité Non-confirmation	5-10 %
Pyroséquençage	M, CNV	Multiplex		10 %
NGS « ciblé » classique	M, CNV, T	Choix du panel	Sensibilité Coût	1-2 %

La PCR en temps réel

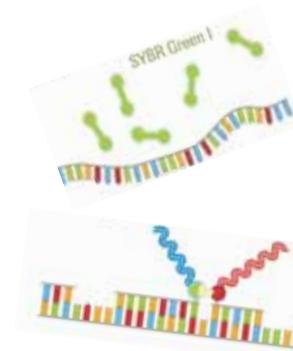
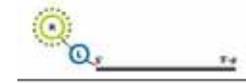
- Principe:

- Même principe que la PCR classique
- Sauf que l'amplification est mesurée durant toute la réaction
- A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée par un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle au nombre d'amplicons produits

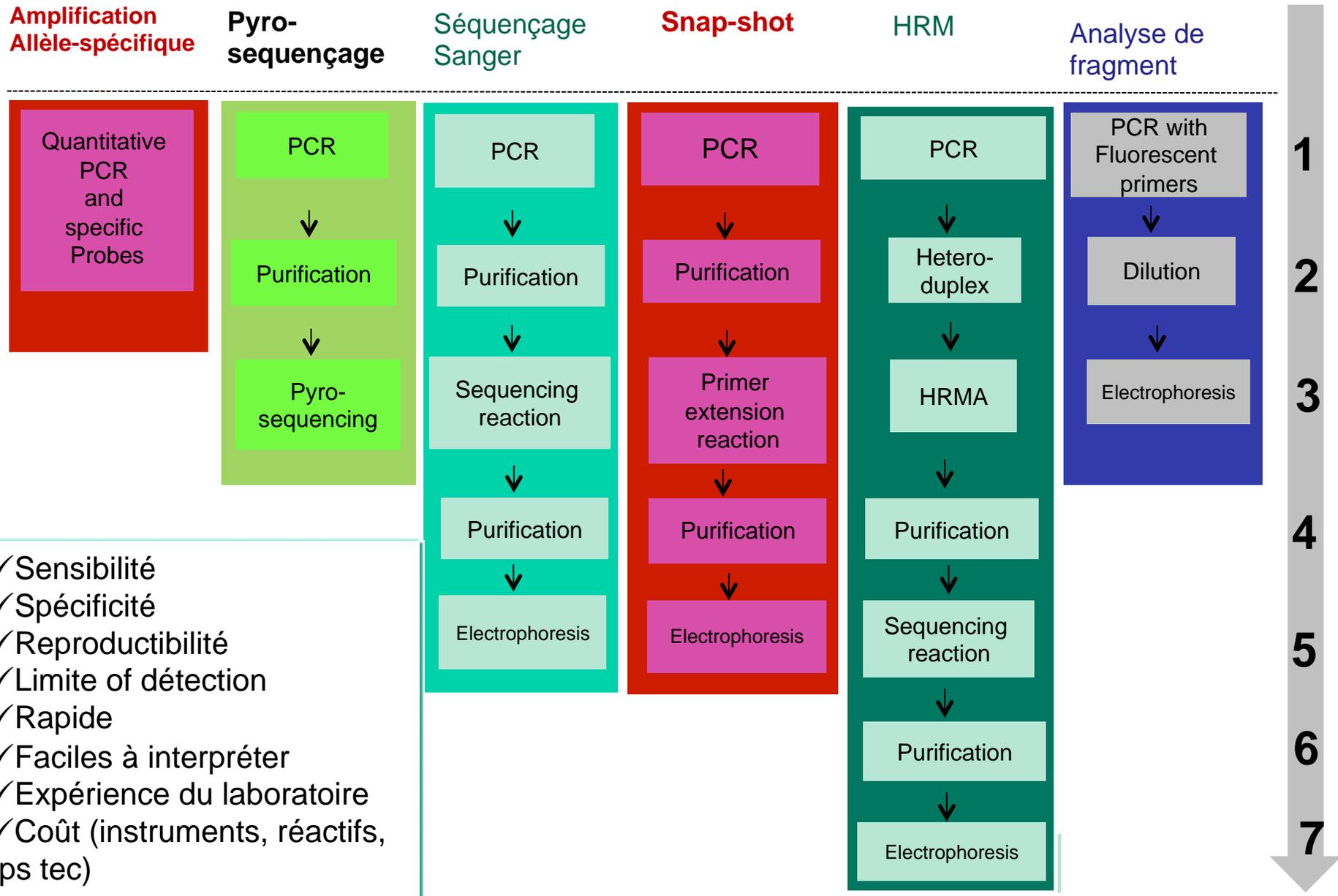


- Méthodes de détection

- Agent intercalent: SyberGreen®
- Sondes
 - Taqman ®: sonde d'hydrolyse
 - HybProbes (FRET): sondes d'hybridation

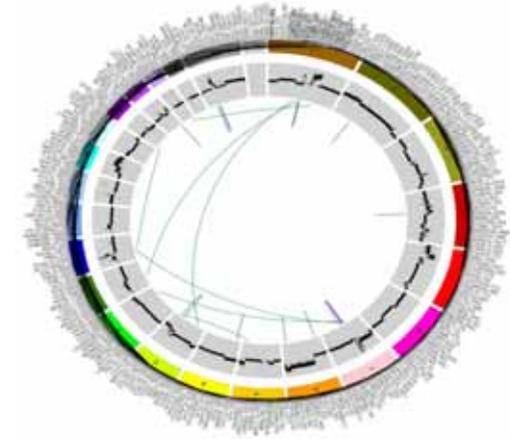


Les différentes techniques alternatives



Les différentes techniques alternatives, ciblées

Technique ciblée	Type de variant détecté	Avantages	Inconvénients	Sensibilité
Analyse de fragment	M	Rapide	Pas les substitutions	10%
PCR allèle-spécifique	M	Rapide	Ciblée	5%
Sonde d'hybridation	M	Rapide	Ciblée	1-5%
PCR en temps réel	M	Rapide	Ciblée Coût	1-10%
Snap-shot	M	Rapide	Etapes	5%
QPCR optimisée	M	Rapide	Coût	0,1%
PCR digitale	M, CVN (T)	Rapide	Ciblée	0,01%

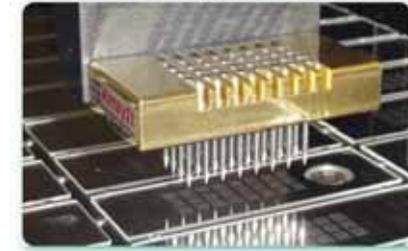


- Introduction
- Quel échantillon analyser?
- Quels critères de qualité de l'échantillon?
- Les techniques de biologie moléculaire
- **Le futur proche**
- La recherche des translocations
- L'interprétation des résultats

CGH array: Comparative Genomic Hybridization

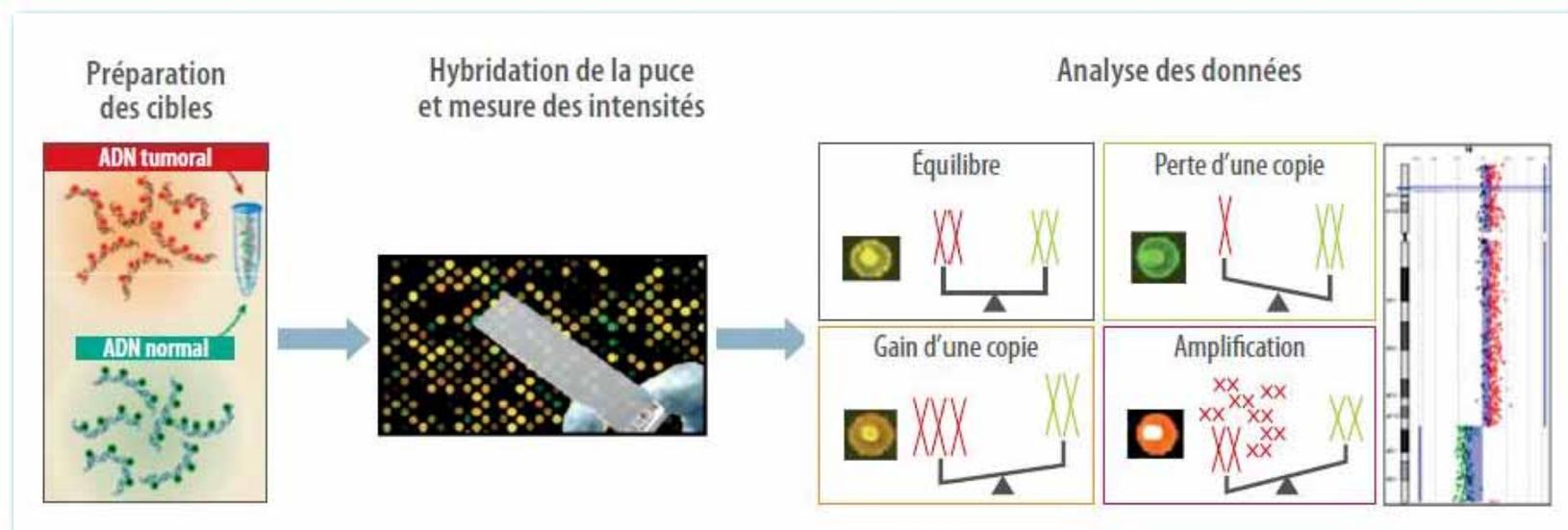
Puces à ADN

- Support de verre sur lequel sont déposées ou synthétisées in situ un très grand nombre de séquences d'ADN correspondant à un génome donné
- Hybridation avec l'ADN à tester marqué par un fluorochrome
- Exploration pan-génomique à haut niveau de résolution



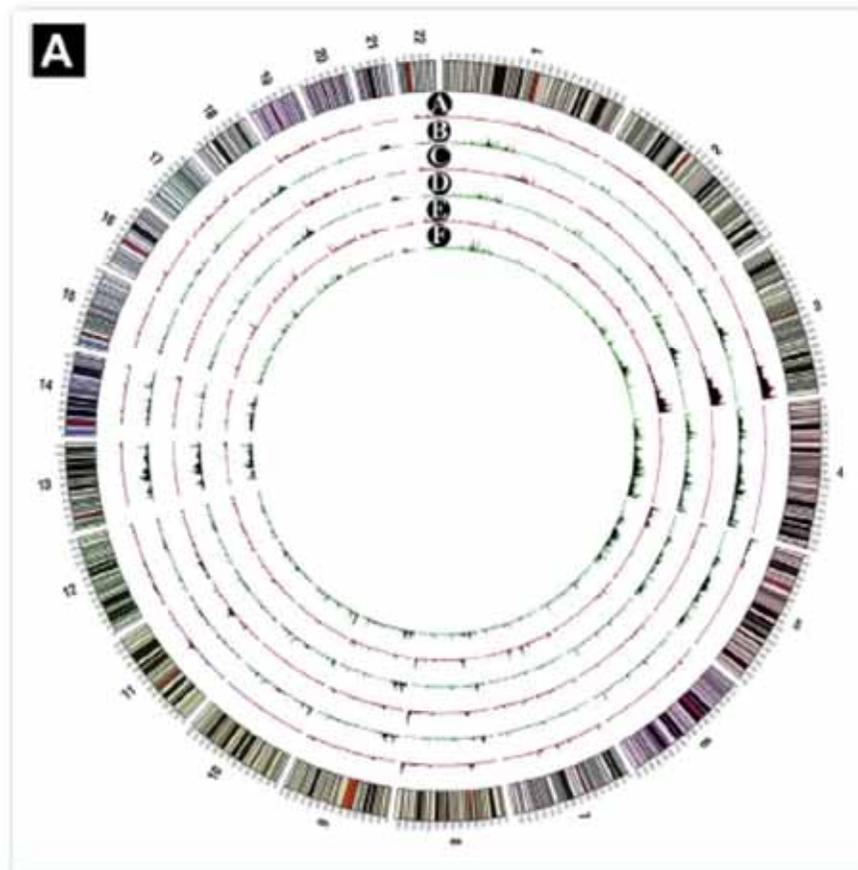
CGH array

- Deux ADN marqués (patient, contrôle) sont hybridés de façon **compétitive** sur des séquences nucléotidiques déposées sur une puce afin de détecter une différence de nombre de copies entre les 2 échantillons au niveau de chacune des séquences



CGH array: Comparative Genomic Hybridization

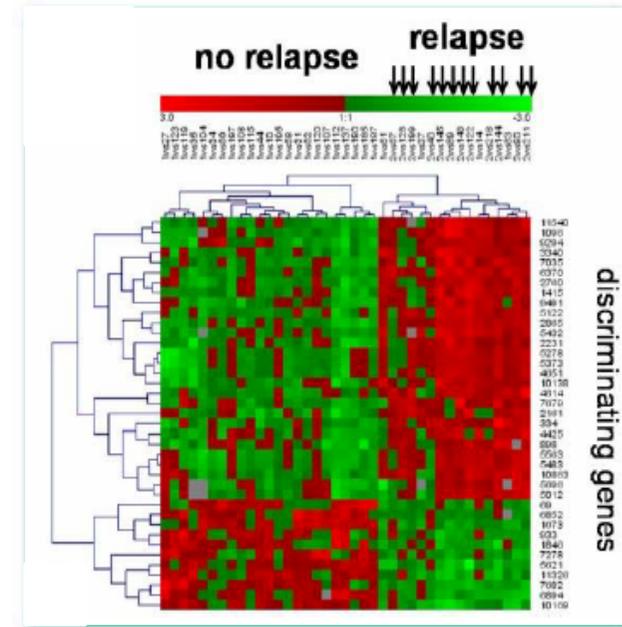
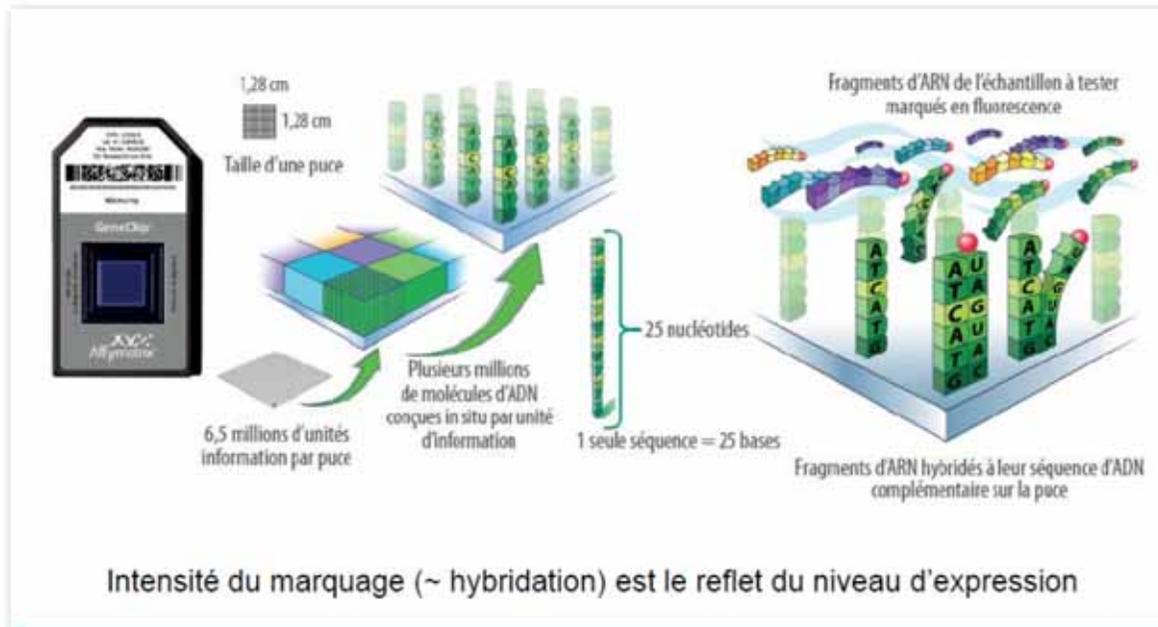
N = 100 carcinomes épidermoïdes opérés
 Tissus paraffine
 Puce Agilent® 44K



Group	Copy Number Gain	Copy Number Loss
LR	3q27.1, 5p15.33, 5p13.3, 5p13.2, 7q22.1, 9p13.3, 13q34	4q35.1, 4q32.3, 4q21.23, 8p12, 9p21.3, 10p15.1, 14q22.3
HR	1q21.2, 2p23.3, 3q27.1, 4q35.1, 4q32.3, 4q21.23, 8q24, 8p12, 9p13.3, 11q23.3, 11q13.1, 12p13.1, 14q32.3, 17q11.2, 19q13.11	1p36.11, 3p25.3, 3p24.3, 3p21.3, 5p15.33, 5p13.3, 5p13.2, 6q23.2, 8p12, 9p21.3, 9p13.3, 10q26, 10p15.1, 7q22.1, 11p15.4, 13q34

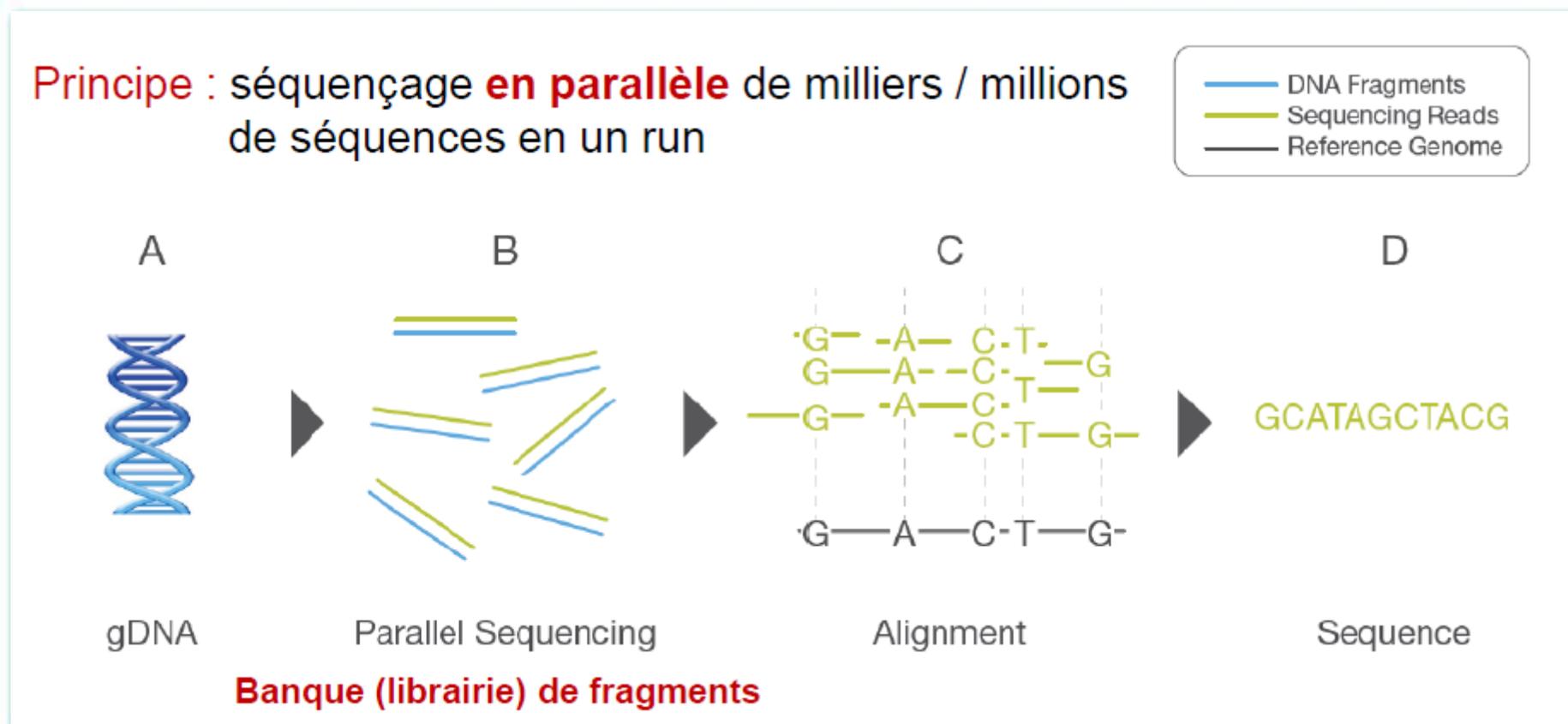
Puces d'expression

Analyse à large échelle de l'expression (ARN) → Signatures moléculaires du génome



NGS: Next Generation Sequencing

Etape 1: constitution des « librairies »



par amplicon

par capture

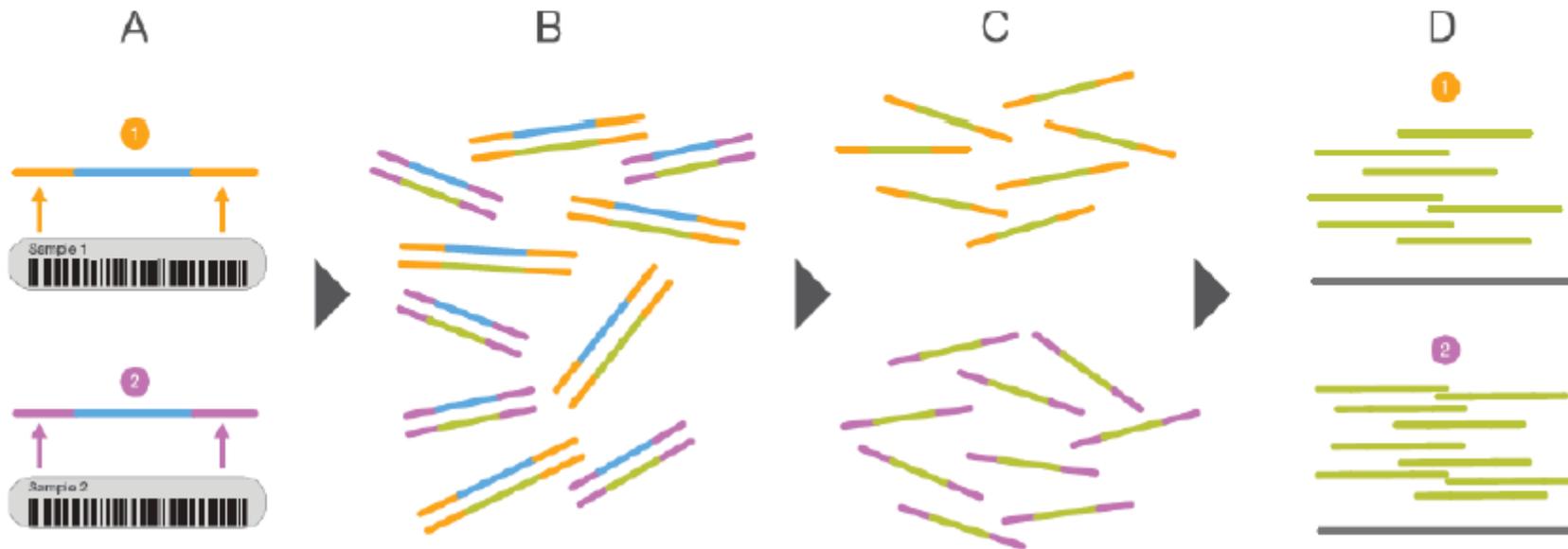
NGS: Next Generation Sequencing

Multiplexage possible de différents échantillons

(« code barre » = séquences spécifiques)

→ Gain d'information + réduction du coût par échantillon

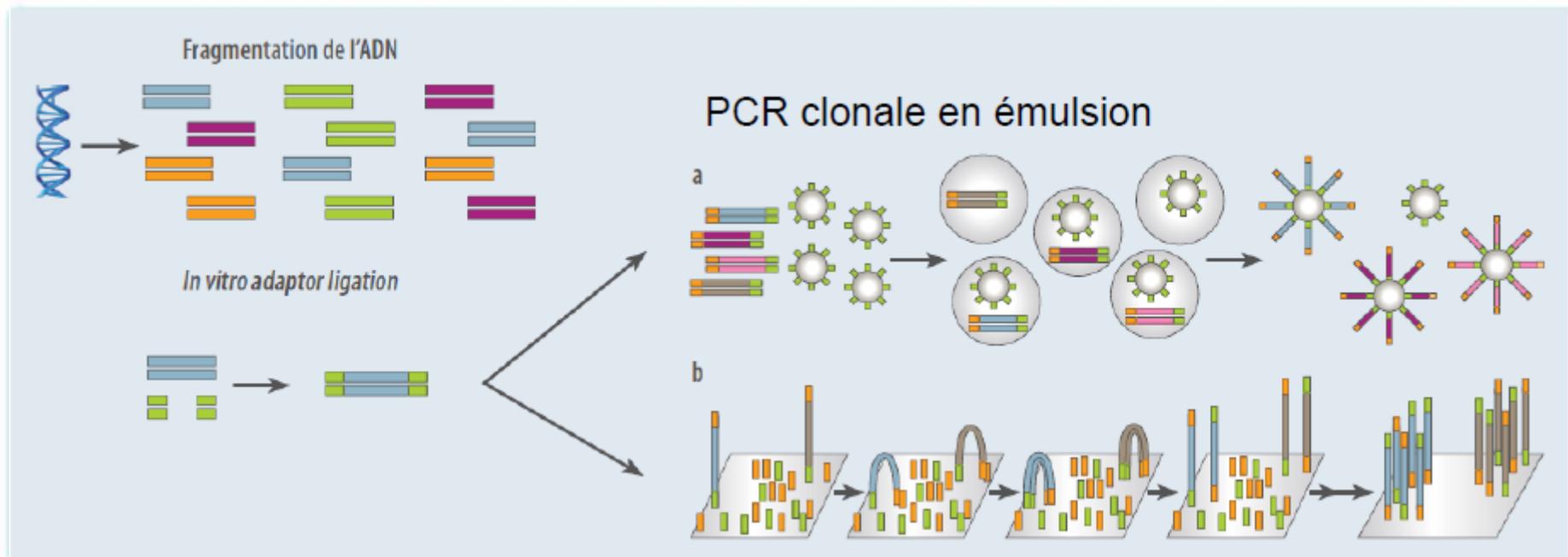
— DNA Fragments
— Sequencing Reads
— Reference Genome
— Sample 1 Barcode
— Sample 2 Barcode



NGS: Next Generation Sequencing

Etape 2: amplification

2 techniques principales d'amplification des banques de fragments générés



PCR in situ sur lames (Bridge PCR) → clusters

NGS: Next Generation Sequencing

Etape 3: lecture

- pyroséquençage (454® Roche)
- microvariations de pH (IonTorrent PGM Proton® Life Technology)
- synthèse/PCR de séquence (MiSeq® ou HiSeq® Illumina)

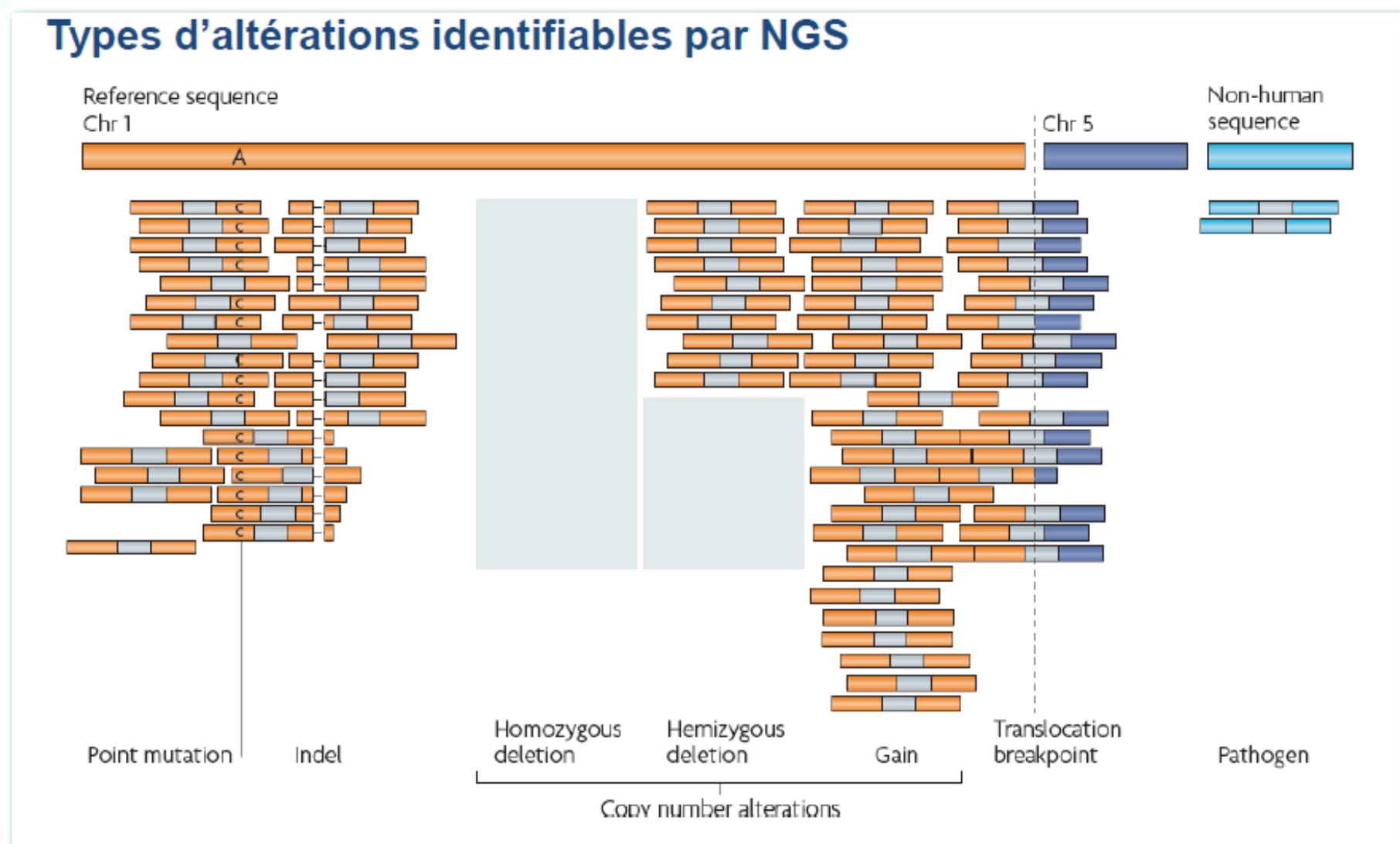
Etape 4: analyse bioinformatique

3 étapes successives

- Analyse primaire: **fichier FastQ** –reads de séquence propre à chaque échantillon
- Analyse secondaire: alignement des séquences de chaque individu sur le génome humain de référence: **fichier BAM -> VCF**
- Analyse tertiaire: annotation des différents **variants**



NGS: Next Generation Sequencing





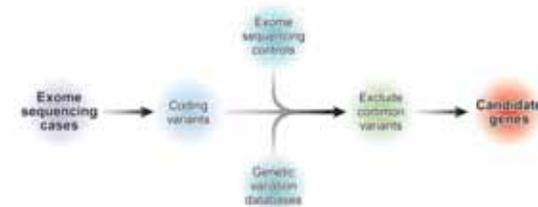
NGS: Next Generation Sequencing

- Sensibilité: 1-2-5-10%
- Différentes technologies: Roche, Life Technologies, Illumina
- Paramètres
 - Profondeur = nombre de « reads »
 - Minimale?, moyenne?: 300-1500 ...
 - Fréquence allélique, FA: nbre de séquences mutées /nbre de séquences analysées
 - Ex: 50/500=10%
 - Couverture suffisante

- Séquençage haut débit

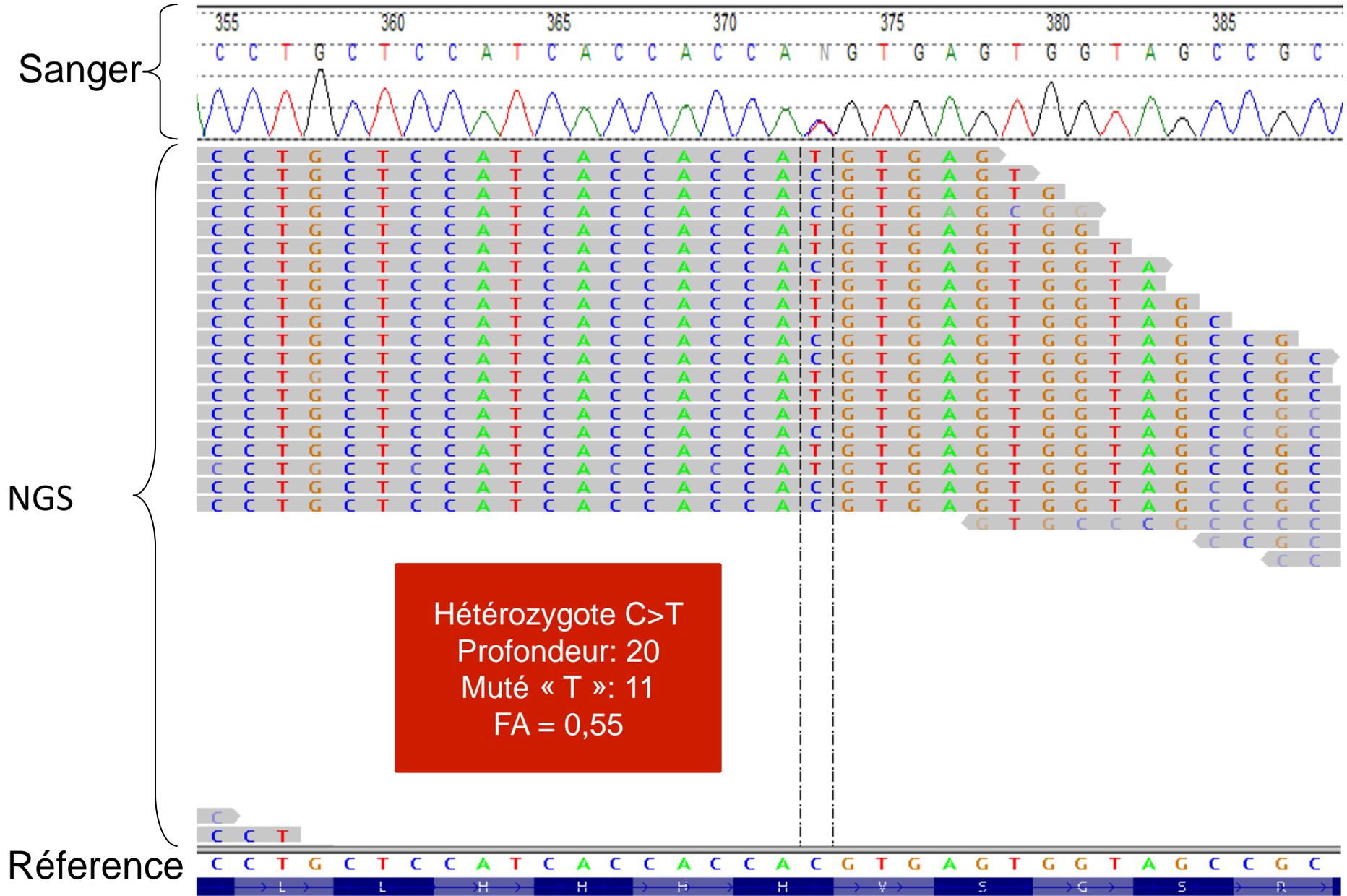
WES: Whole Exome Sequencing

WGE: Whole Genome Sequencing



- Séquençage moyen débit « ciblé »
 - Séquençage de zones spécifiques du génome (hot-spots)
 - Informations plus restreintes: plus facile
 - Données quantitatives
 - Différents panels

Exemple de détection d'un variant sur une base



NGS: Next Generation Sequencing « Ciblé »

- Panel INCa : 26 gènes
- Panel Ionampliseq ColonLung (Life technology®)
- Panel TruqSight Tumor Panel (Illumina®)
- Panel Multiplicom®
- .../...

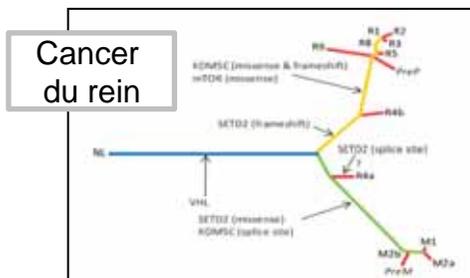
NGS: Next Generation Sequencing WES

L'hétérogénéité intra-tumorale (ITH) ?
Dès les stades localisés ...

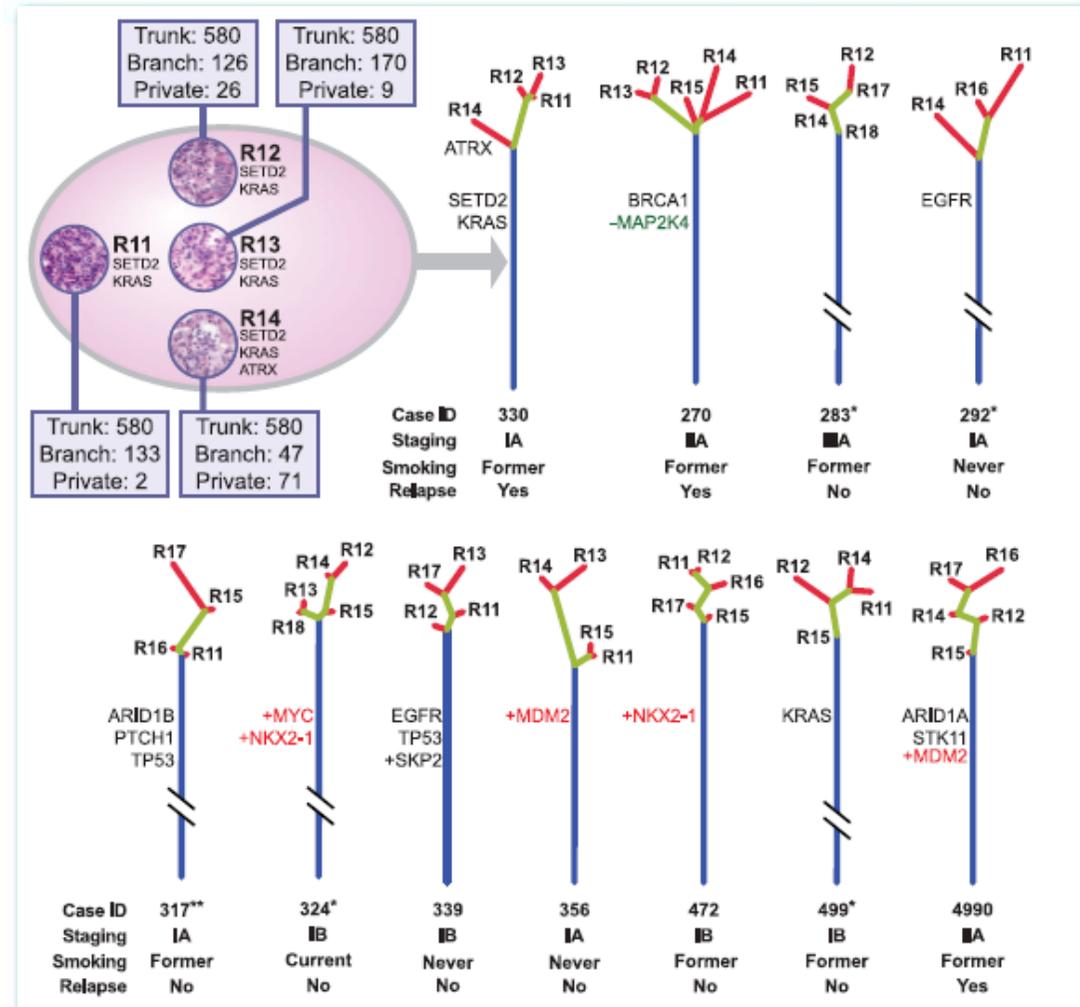
n= 11 ADC localisés opérés

48 régions analysées WES avec une profondeur de 277x

7026 mutations somatiques identifiées



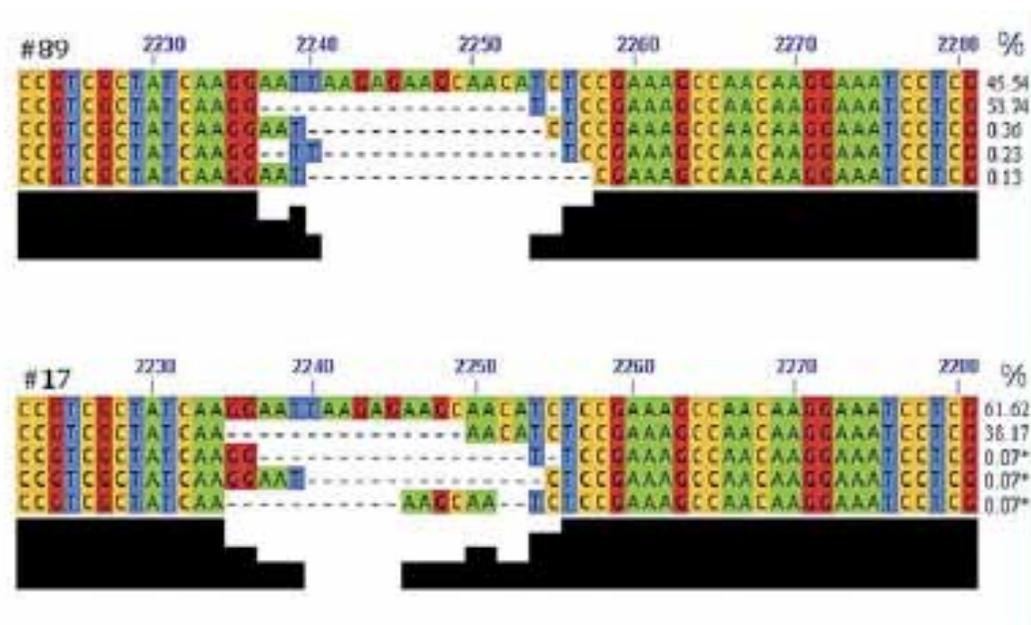
Gerlinger M, NEJM 2012



Zhang J, Science 2014

NGS: Next Generation Sequencing « Ciblé »

- 116 CBNPC: 106 del exon 19, 10 wild-type (SS)
- NGS (454 GS Junior)
 - Toutes dél retrouvées; pas de dél chez wt
 - 88% des cas (n= 93): dél identiques
 - 20% des cas (n=21): mutations complexes (doubles/multiples)
 - 43% des cas (n=46): sous-populations avec mutations différentes
 - 0.1 à 17% de l' ADN génomique

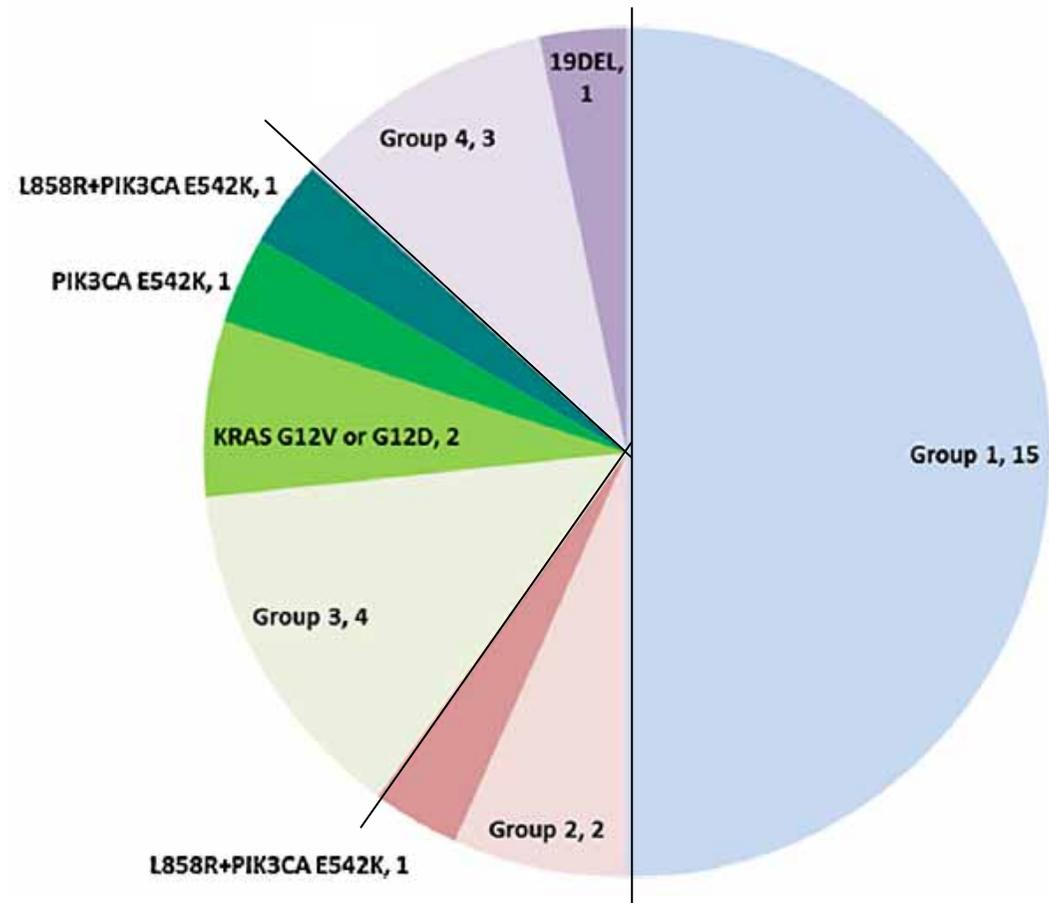
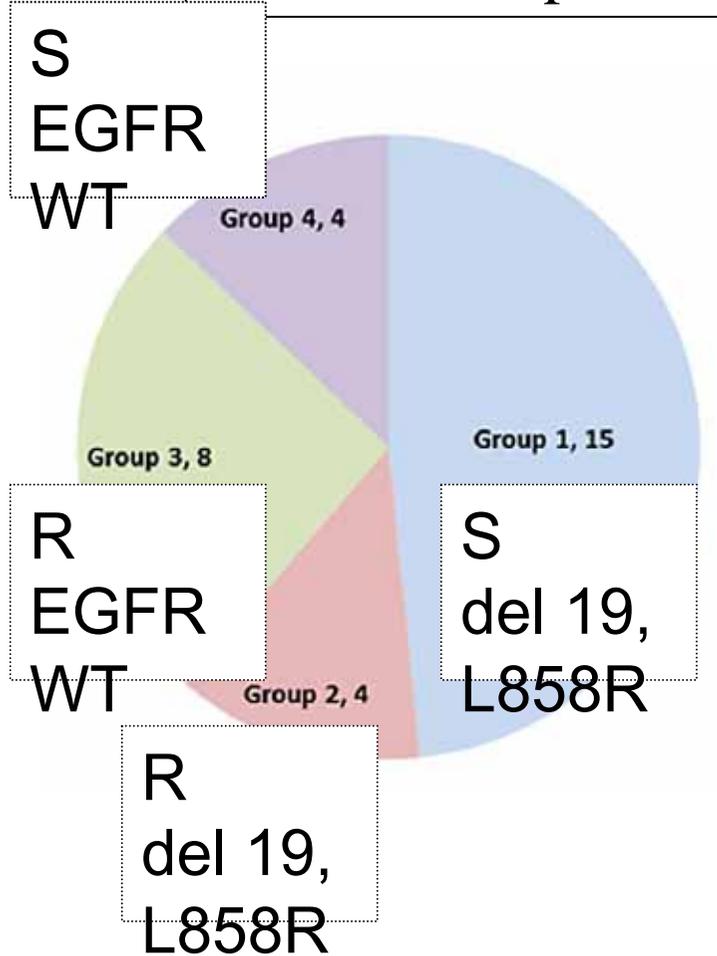


NGS: Next Generation Sequencing « ciblé »

- n = 48 CBNPC, NF

Technique Sanger,
et PCR clampée

NGS (46 gènes)



NGS: Next Generation Sequencing « Ciblé »

ADC, ancien fumeur

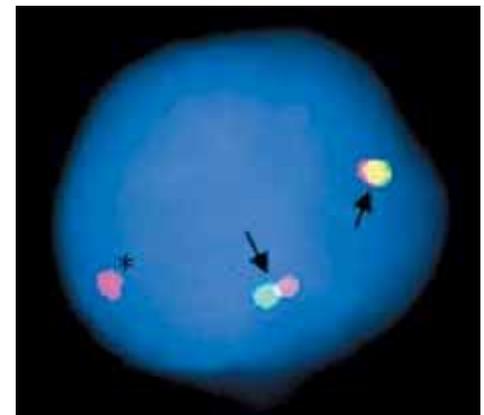
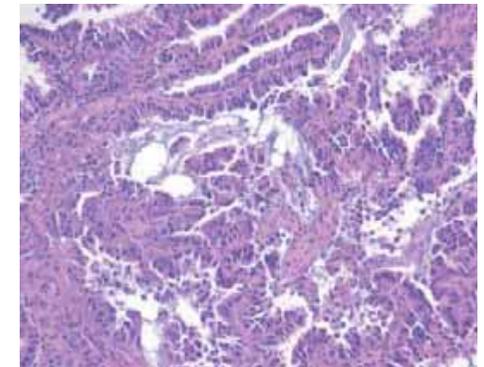
Translocation ALK FISH (70%)

Résistance au crizotinib puis à AP26113

NGS ciblé, panel

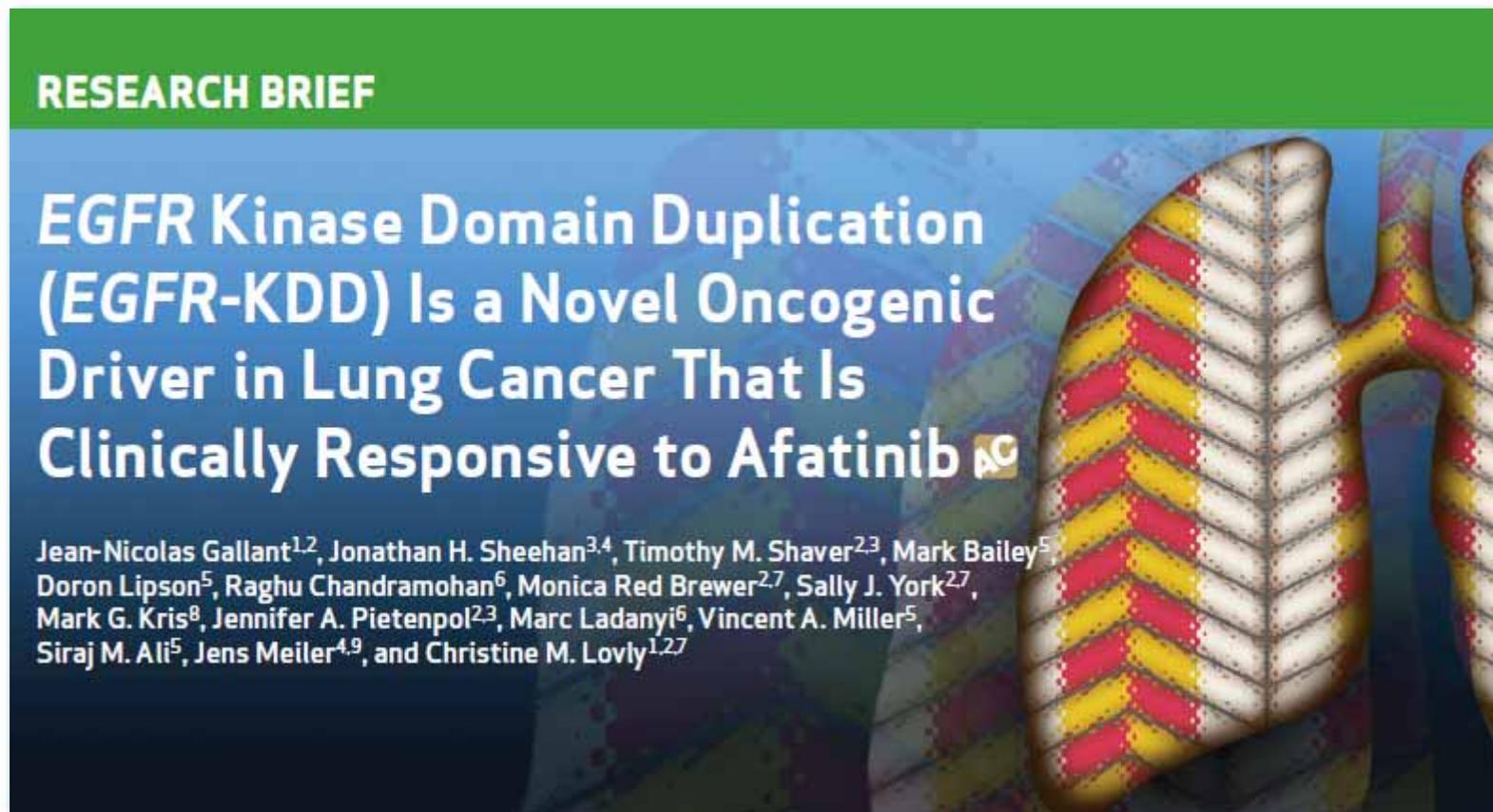
FA 25% pour les 3 mutations

Gene	Gene name	Variant type	Effect	cDNA change	Protein change	Variant allelic frequency (variant reads/total reads)
<i>ATM</i>	ataxia telangiectasia mutated serine/threonine kinase	Deletion	Frame shift	c.5891_5912delAGAAAA GTATGGATGATCAAGA	p.K1964fs	28.5% (2138/7514)
<i>KRAS</i>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Single nucleotide variation	Non-synonymous alteration	c.C64A	p.Q22K	23.0% (1883/8180)
<i>STK11</i>	serine/threonine kinase 11	Insertion	Frame shift	c.157_158insT	p.D53fs	28.4% (254/894)



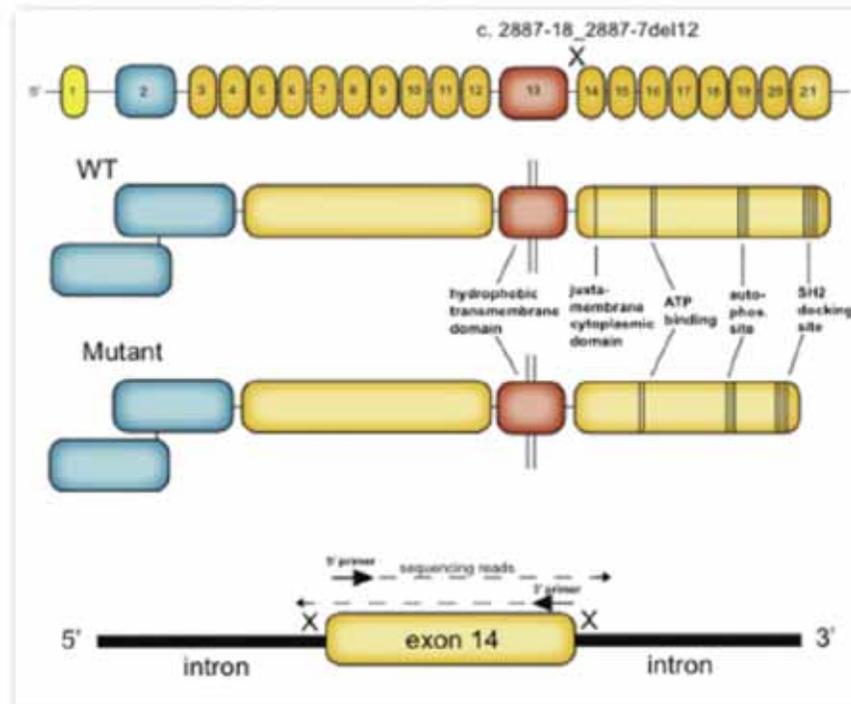
- La fin des altérations moléculaires exclusives ?
- Le début d'altérations moléculaires complexes ?

Duplication d' EGFR

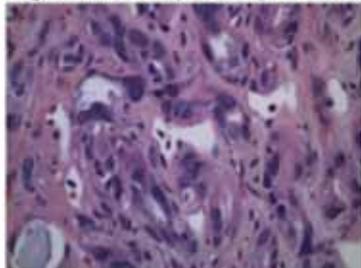


- Quelle couverture? Exon 25 ...
- RNA seq?

Mutations de MET: délétion exon 14

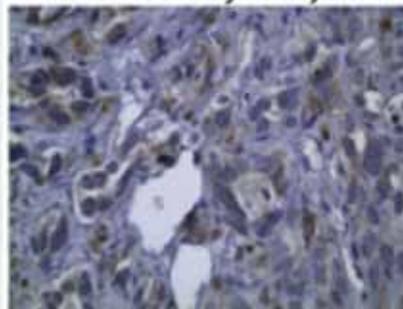


Targeted NGS (H&E specimen)

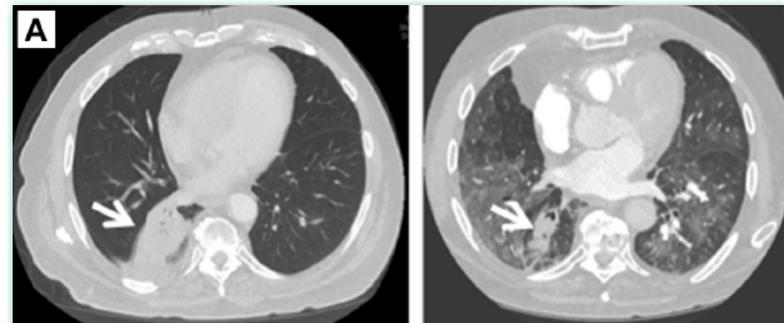


- MET exon 14 splice site mutation (c. 2887-18_2887-7del12)
- CDKN2A/B loss
- CDK4 amplification
- MDM2 amplification

IHC Pathway Analysis



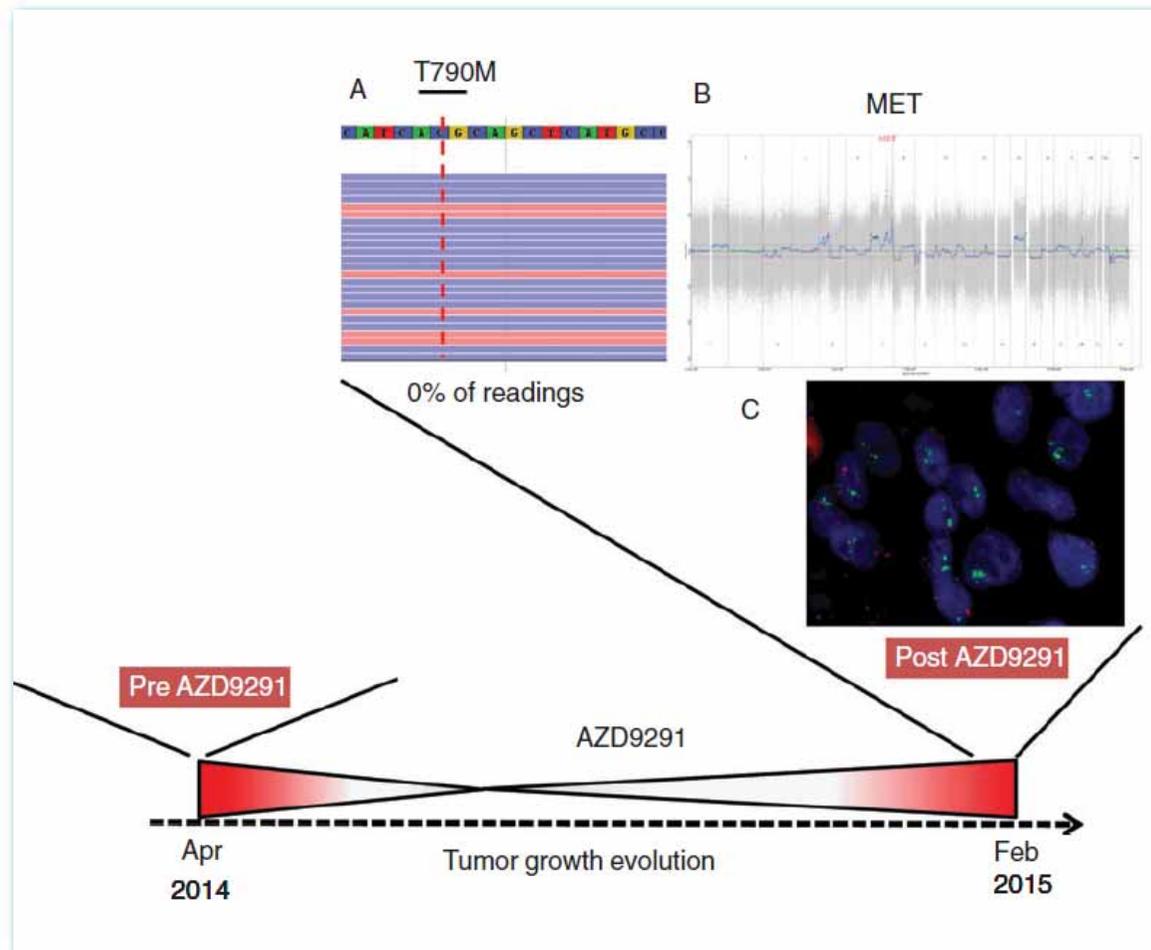
p-c-MET (Tyr1234/1235)



Résistance secondaire à l'AZ9291

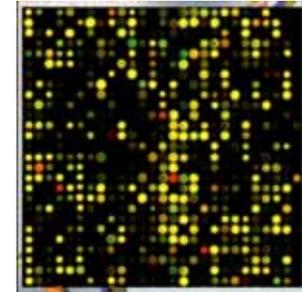
NGS
WES
RNA seq
CGH

(*MOSCATO*)



Amplification de MET

RNAseq



Etude transcriptomique de séquençage d'ARN à grande échelle

Séquençage de tous les ARN

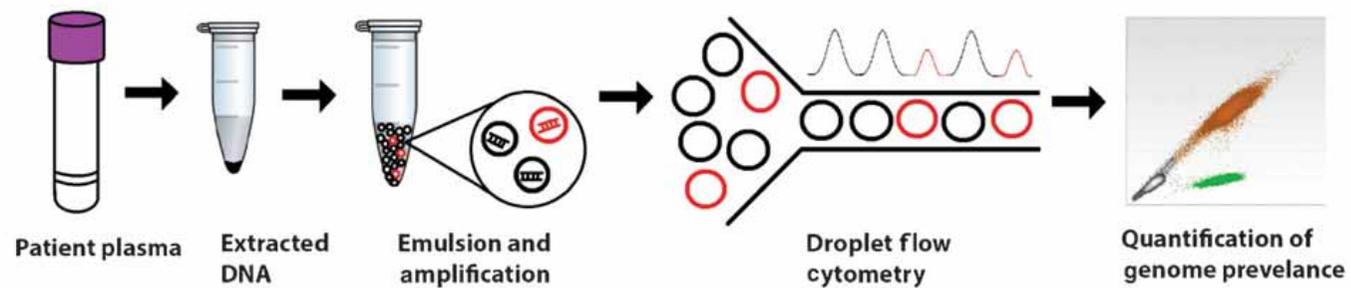
Plusieurs dizaines de milliers de messagers possible

Remplace les puces d'expression (microarray ARN)

Mise en évidence de nouveaux transcrits

➤ Qualité des ARN

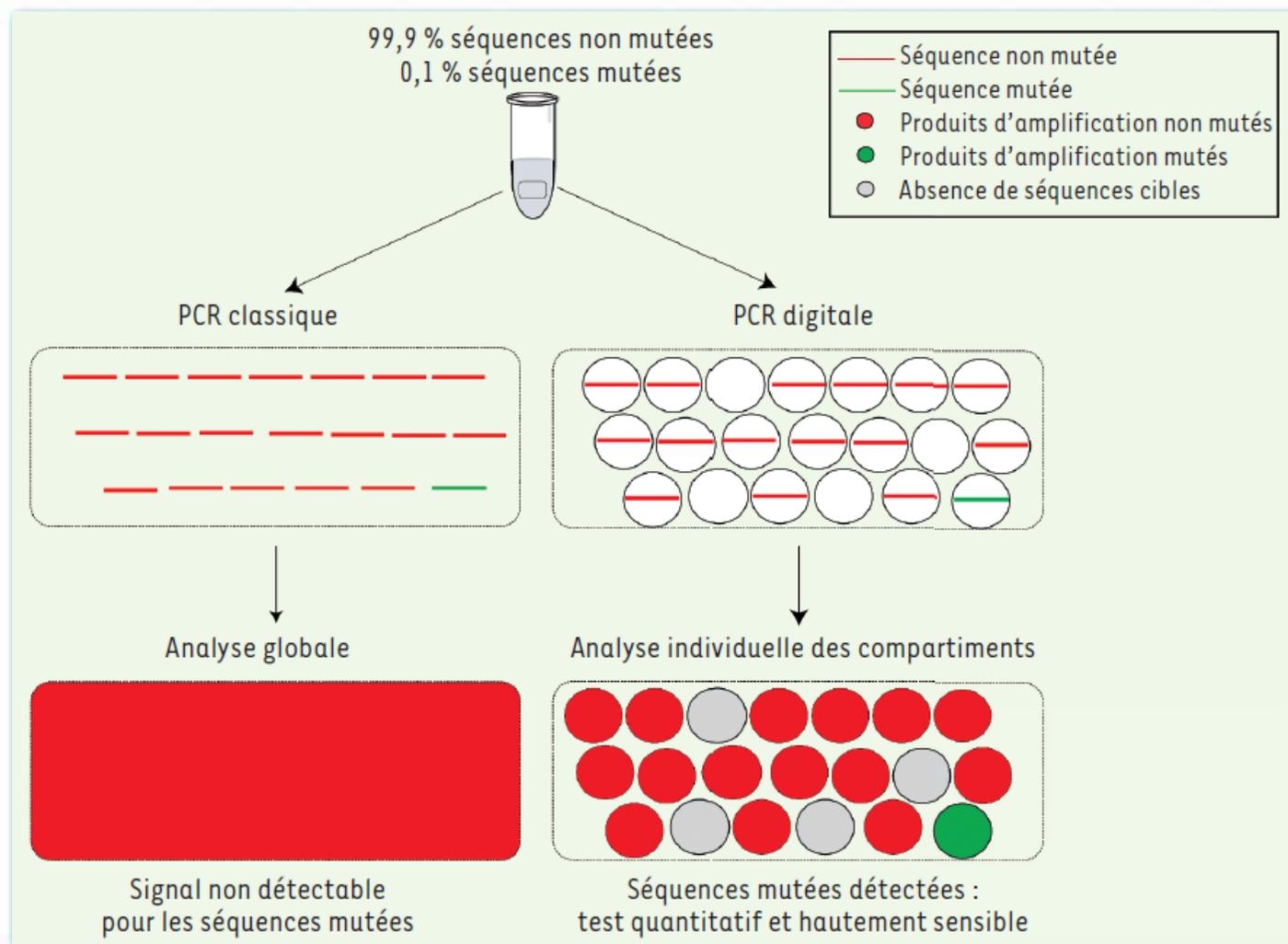
La PCR digitale en micro-compartiments



PCR digitale et autres techniques

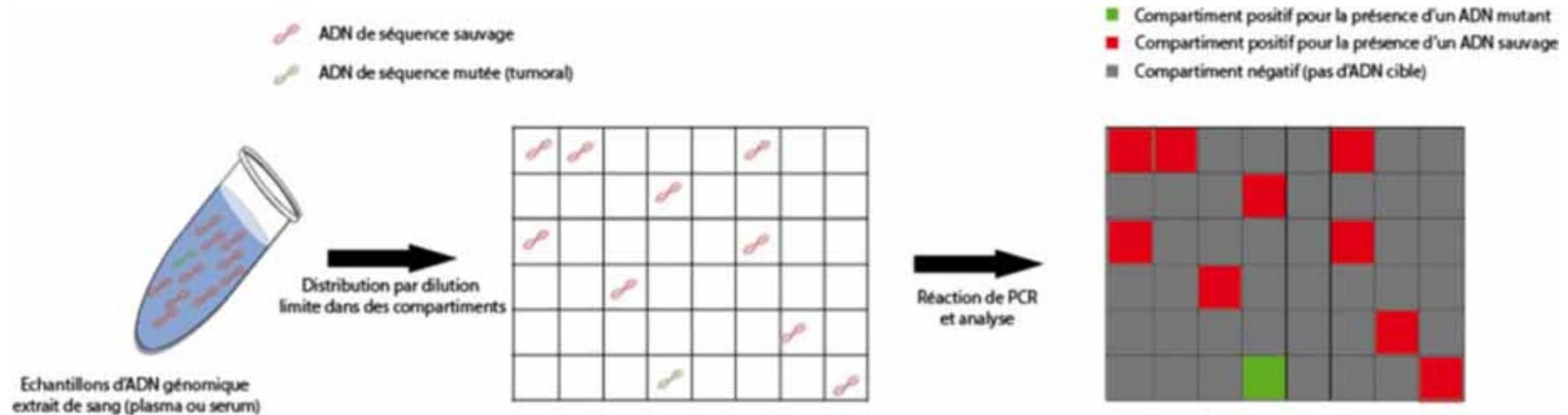
Méthodes	Fraction d'ADN tumoral détectable (sensibilité)	Type d'échantillons analysables
Séquençage par la méthode Sanger	> 10%	Tissu tumoral
Pyroséquençage	5-10%	Tissu tumoral
High resolution melting (HRM, courbes de fusion en qPCR)	5%	Tissu tumoral
Séquençage de nouvelles générations	1-5%	Tissu tumoral
qPCR en temps réel (Taqman®)	1-10%	Tissu tumoral
qPCR en temps réel optimisée (ARMS, CAST PCR, etc.)	0,1-0,01%	Suivi qualitatif de l'ADN tumoral circulant, détection de variant rares dans les tissus
PCR digitale en microcompartiments	< 0,001%	Suivi qualitatif (nombre restreint de marqueurs cibles) et quantitatif de l'ADN tumoral circulant, détection et quantification de variant rares dans les tissus
Séquençage de nouvelles générations optimisé (Safe Seq*, TAM-seq)	> 0,01%	Suivi qualitatif (grand nombre de marqueurs cibles) et quantitatif de l'ADN tumoral circulant, détection et quantification de variant rares dans les tissus

PCR digitale: principe



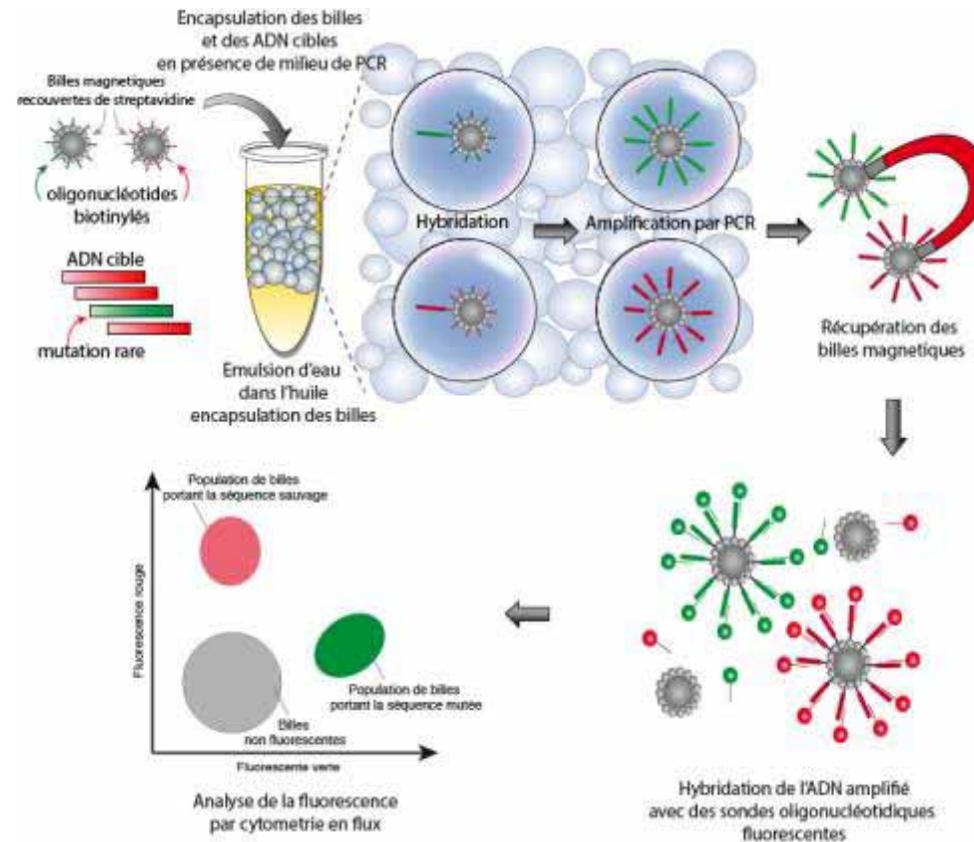
➤ La PCR digitale permet un comptage discret des séquences ciblées et est donc à la fois très sensible et quantitative.

PCR digitale: principe



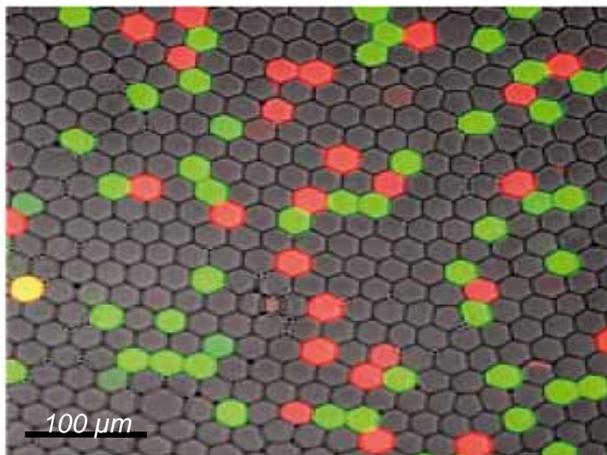
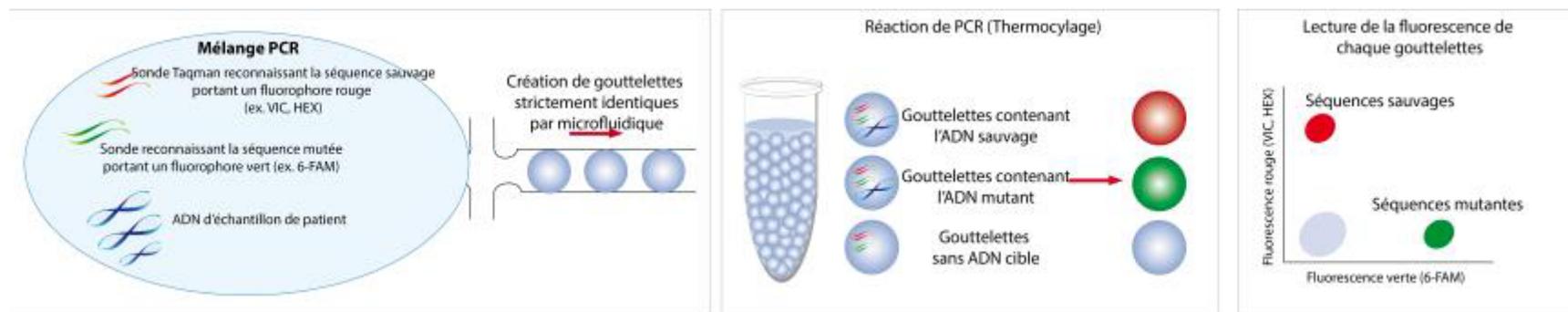
- Les compartiments peuvent être des puits de microplaques, des microcompartiments microfluidiques ou des microgouttelettes aqueuses.
- La sensibilité de la PCR digitale dépend du nombre de compartiments (et donc de molécules uniques) analysés.

PCR digitale par BEAMing (Billes, Emulsion, Amplification et Magnétique)



- Sensibilité démontrée pour 1 séquence mutante parmi ~10,000 séquences sauvages
- Procédure quantitative mais relativement complexe à mettre en œuvre

PCR digitale en microfluidique de gouttes

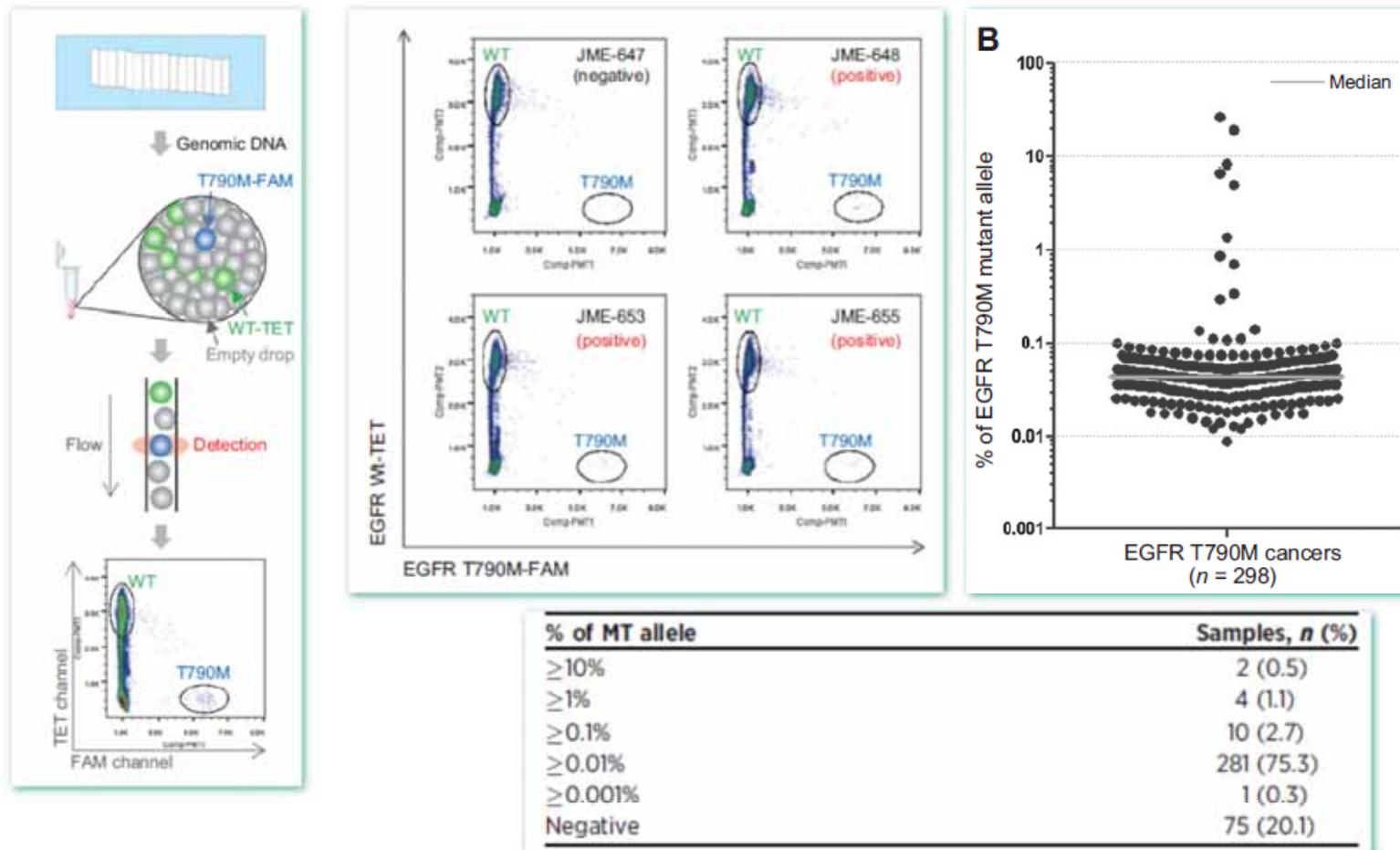


Exemple de la détection de mutations de l'oncogène *KRAS* en microgouttelettes

- Sensibilité démontrée pour 1 séquence mutante parmi ~200,000 séquences sauvages
- Procédure quantitative et relativement simple à mettre en œuvre

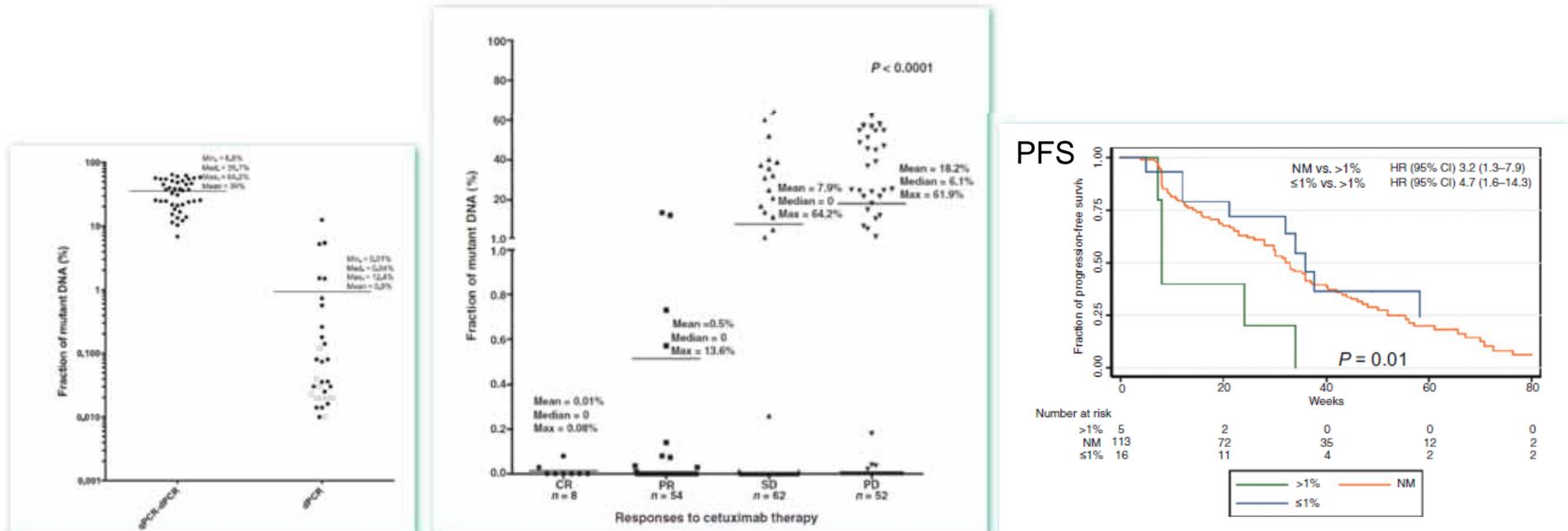
PCR digitale: applications

- Mutation T790M dans une série de CBNPC opérés, EGFRm
 - Sensibilité analytique: 0,001%
 - Incidence de la mutation T790M: 79.9% (298/373)
 - Plus fréquemment en cas de mutation EGFR commune et en cas de « T » élevé



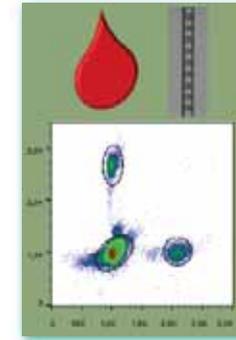
PCR digitale: applications

- Mutations KRAS dans les cancers colo-rectaux métastatiques
- N= 136 wt, 41 KRAS mutés



➤ Absence de valeur prédictive négative des sous-clones KRAS mutés

Comparaison entre la PCR digitale et le séquençage de nouvelle génération pour l'analyse de l'ADN tumoral circulant

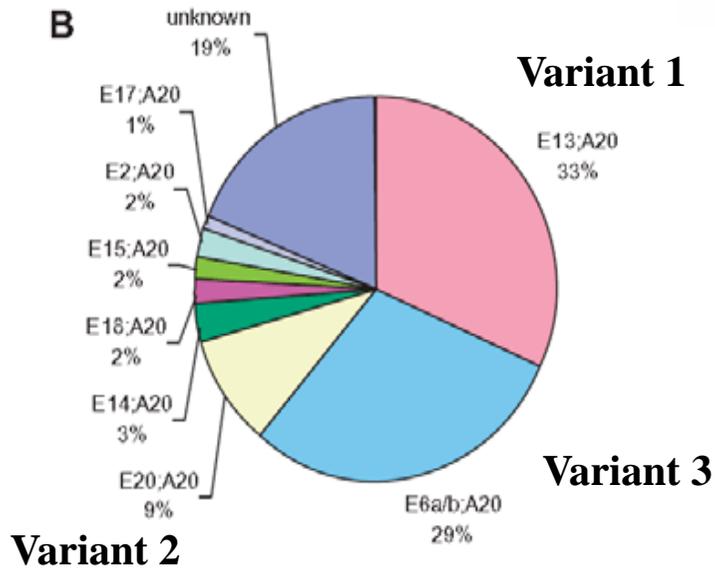
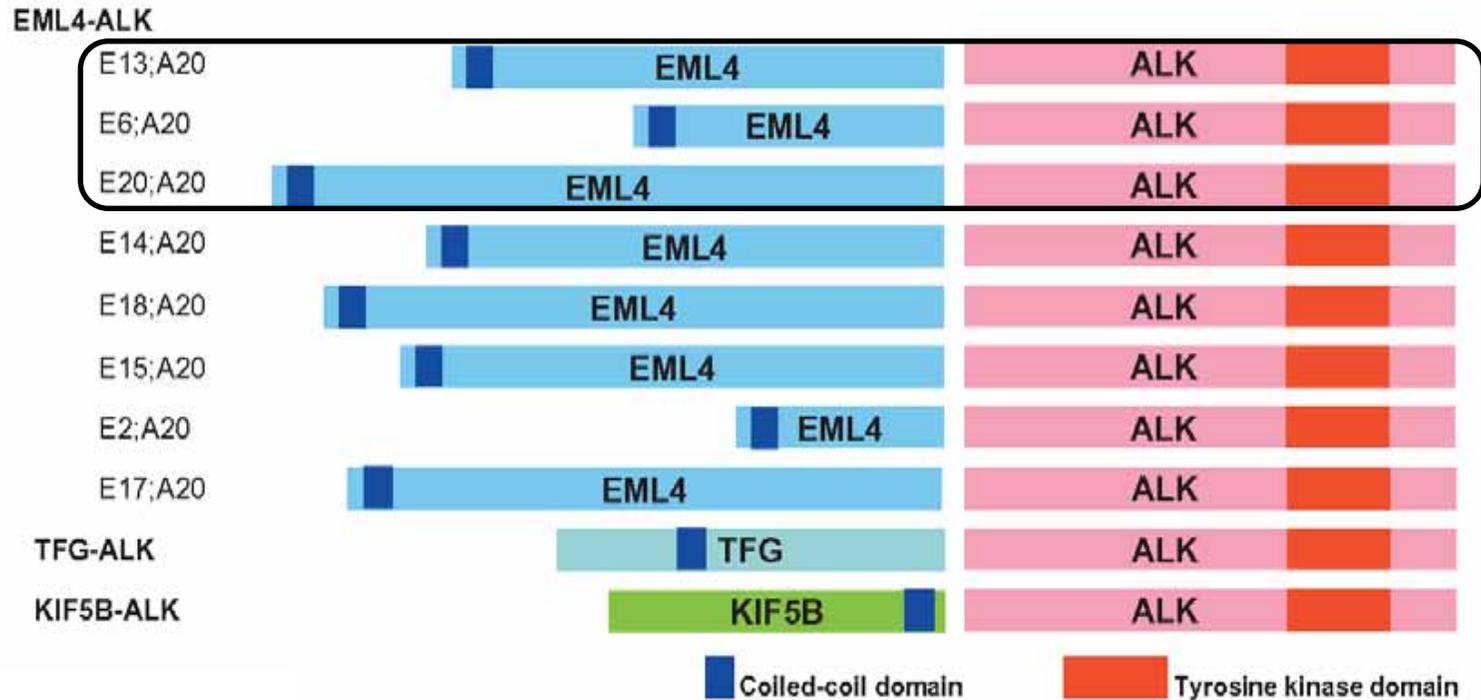


	Séquençage de nouvelle génération (NGS)	PCR digitale en microcompartiments
Sensibilité	>10% pour le séquençage d'exomes 1-5% pour le NGS ciblé classique (séquençage profond, >1000 reads) <0,1% pour les méthodes optimisées (Tam-Seq, Safe-Seq, etc.)	Dépend principalement du nombre de compartiments analysés, de la quantité d'ADN amplifiable disponibles et du taux de faux positif du test utilisé. <0,001%
Capacité de multiplexage	>100 amplicons (150-200 pb) pour les procédures de séquençage ciblé classiques	5-10 cibles maximum
Facilité d'analyse des résultats	Complexe mais de nombreux logiciels ont été développés	Relativement simple
Applications	Analyse de génome tumoral et de ses évolutions sans <i>a priori</i> , analyse et suivi de l'hétérogénéité tumorale	Analyse et suivi d'un ou plusieurs marqueurs génétiques, analyse de sous-clônes tumoraux rares, validation de résultats de séquençage

- Le séquençage de nouvelle génération et la PCR digitale peuvent permettre de suivre l'ADN tumoral circulant

- Introduction
- Quel échantillon analyser?
- Quels critères de qualité de l'échantillon?
- Les techniques de biologie moléculaire
- Le futur proche
- **La recherche des translocations**
- L'interprétation des résultats

Exemple des translocations d' ALK



- EML4-ALK Variants**
- E13;A20 E13;A20 (variant 1), E13;ins69 A20
 - E6;A20 E6a/b;A20 (variant 3a/b)
 - E20;A20 E20;A20 (variant 2), E20;ins18A20
 - E14;A20 E14;ins11del49A20(variant 4), E14;del12A20 (variant 7)
 - E18;A20 E18;A20 (variant 5)
 - E15;A20 E15 del19;del20A20 (variant 4)
 - E2;A20 E2;A20 & E2;ins117A20 (variant 5a/b)
 - E17;A20 E17;ins68A20
- NSCLC Cell lines**
- H3122 and DFCI032 contain E13;A20. H2228 contain E6;A20

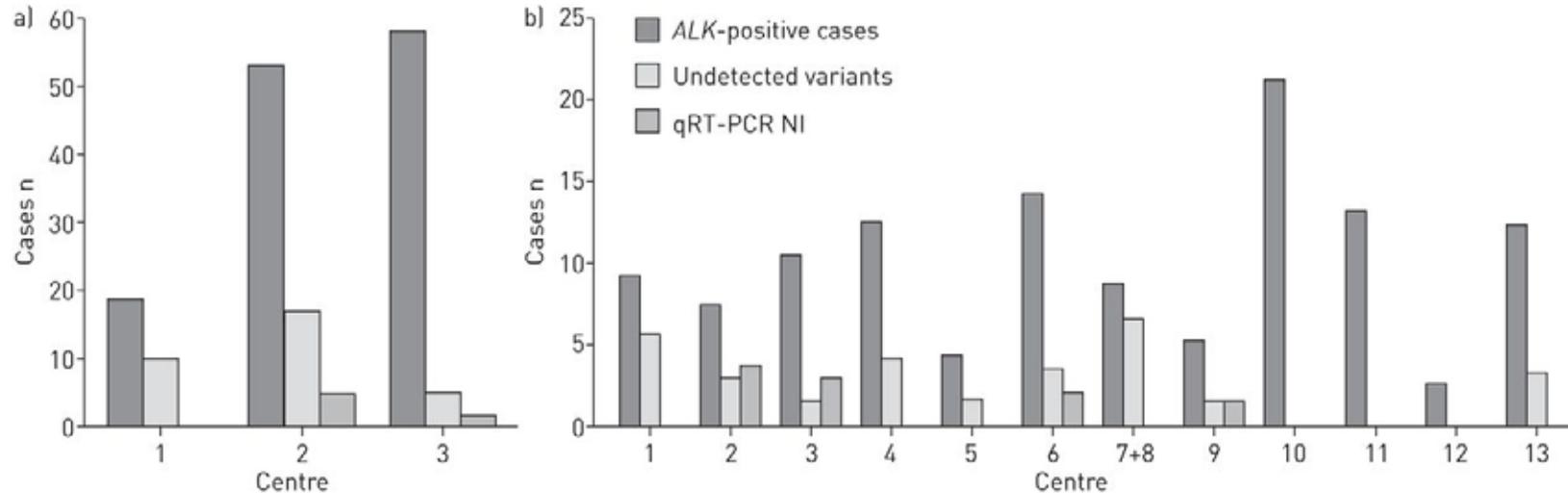
RT-PCR

- 547 CNBPC (mars 2012 à septembre 2013):
- 14 plate-formes, dont 3 pour la RT-PCR
- *EML4-ALK* TaqMan gene expression assays (Fisher Life Technologies, Paisley, UK)
pour la détection de 5 transcrits: V1, V2 E17;A20, V3a/b, V5 et V7
(Hs03654558, Hs03654556, Hs03654557 Hs03654560,
Hs03654559)
- Et RPL13A, gène de référence.

	<i>ALK</i> FISH- positive tumours	<i>ALK</i> FISH- negative tumours	
n	140	400	
qRT-PCR			
Mean RNA extracted ng·μL ⁻¹	139	174	0.06
<i>ALK</i> variant Ct	35 (26–44)	30 (26.6–35)	0.05
Reference gene Ct	26 (21–37)	26 (21–35)	ns
No <i>ALK</i> variant detected	50 (36)	378 (95)	<0.0001
Variant 1	33 (24) [#]	1	<0.0001
Variant 2	9 (6)	0	<0.0001
Variant 3a/b	29 (21)	0	<0.0001
Variant 5	3 (2) [¶]	0	0.03
Variant 7	1 (1)	0	ns
Not available	14 (10)	9 (2)	0.0004
Not interpretable	5 (4)	10 (2)	ns

[#]: one with 2 and 3a; [¶]: one with 3a and one with 7J.

Quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) data according to a) centres in charge of qRT-PCR and b) initial pathology centres.

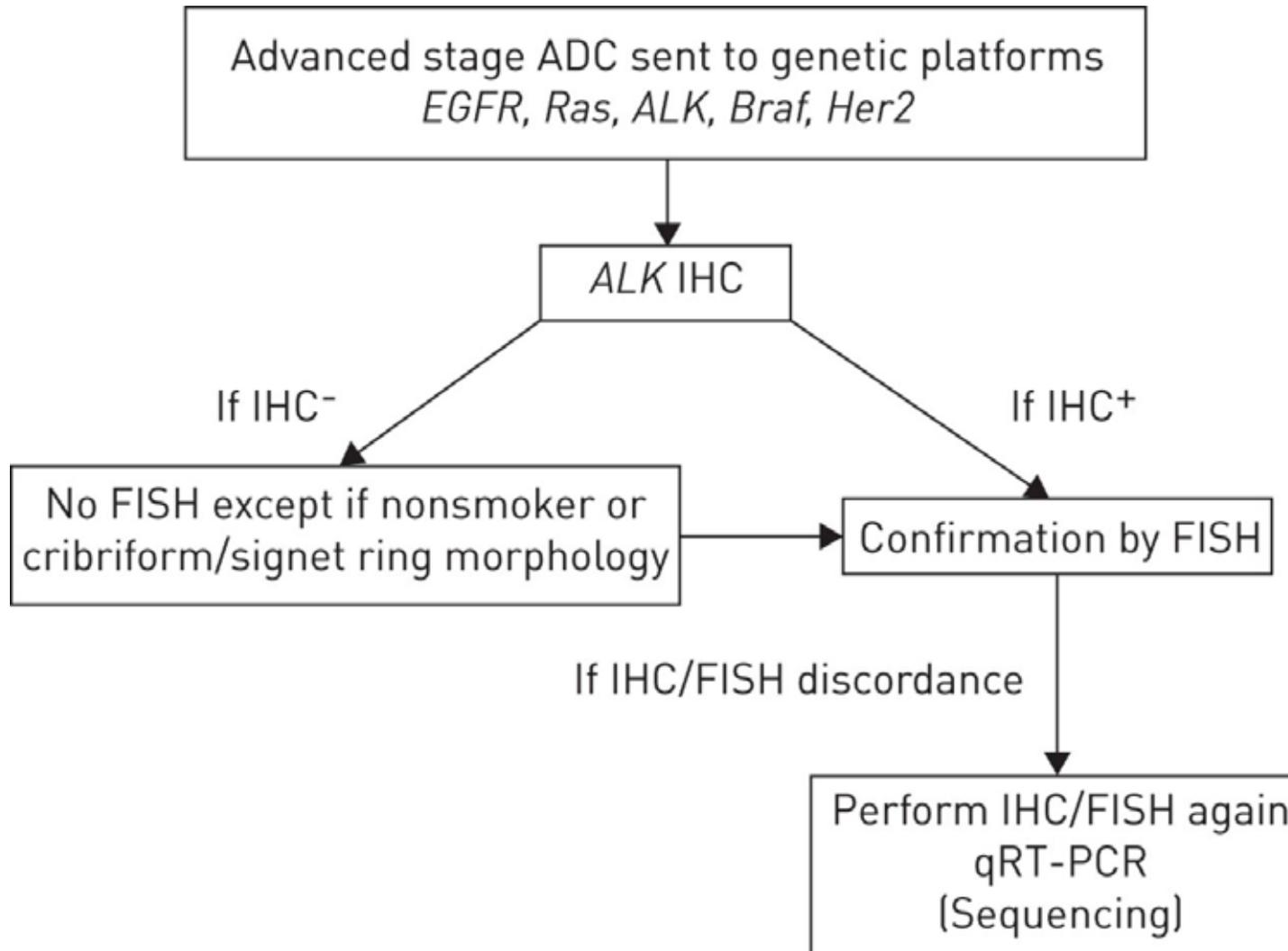


Résultats FISH/IHC: 25 cas entre 10-20%

- 12 cas entre 10-14%: 8 IHC +; 2 cas + en RT-PCR (variant 1 et 3)
- 13 cas entre 15-20%: 4 IHC +; 6 IHC -: 1 cas + (variant 1), 1 ND

- RT-PCR: Technique très spécifique dont la « sensibilité » dépend du panel de variants analysés
- RT-PCR: peut rattraper des cas discordants

Proposition d' algorithme



RT-PCR et translocation ALK

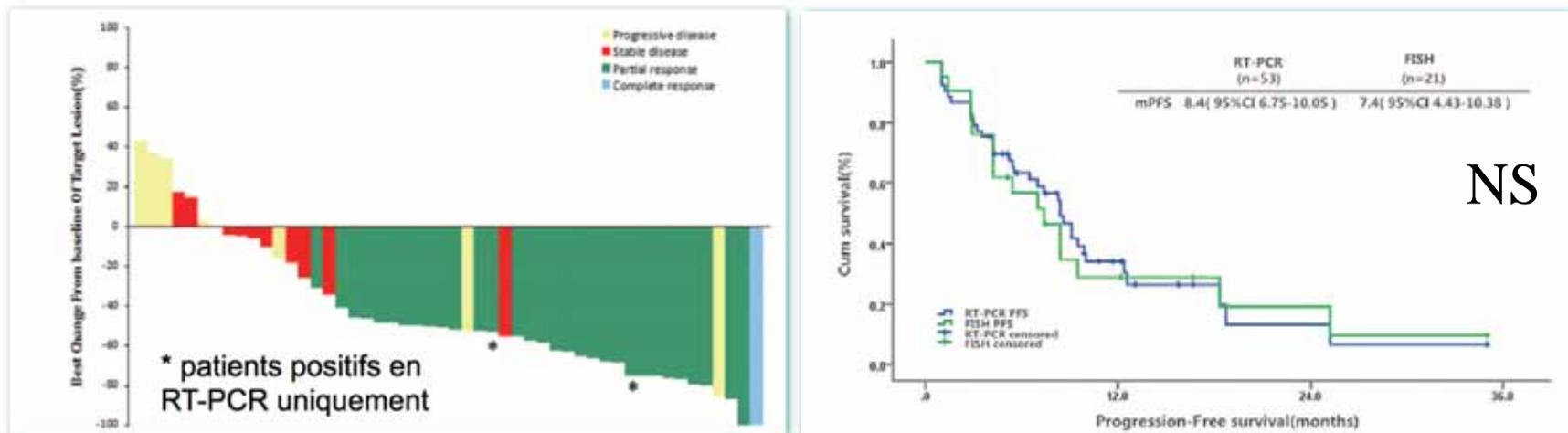
N=430, 46 (10%) sont ALK transloqués

RT-PCR pour 3 variants: variant1, variant 2, variant 3a/b

		FISH		Total	Sensitivity	Specificity	Concordance rate
		Positive	Negative				
Ventana IHC	Positive	46	7	53	100%	98.2%	98.4%
	Negative	0	377	377			
	Total	46	384	430			
RT-PCR	Positive	44	20	64	95.7%	87.0%	89.0%
	Negative	2	134	136			
	Total	46	154	200			

Quelle valeur prédictive pour les translocations mises en évidence par RT-QPCR ?

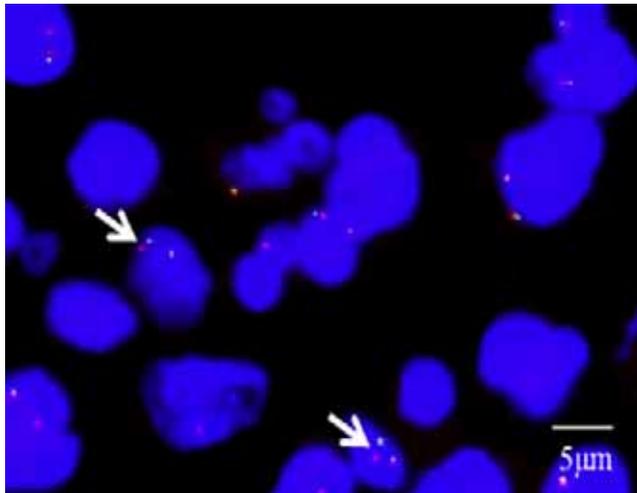
- RT-PCR: technique très spécifique, **sensible pour** les variants recherchés,
 - N =1010, 104 avec une translocation ALK en RT-PCR
 - 53 patients traités par crizotinib
- | | | |
|--------|-----------------|-------------|
| RT-PCR | mPFS = 8,4 mois | ORR = 60,4% |
| FISH | mPFS = 7,4 mois | ORR = 57,1% |



➤ Même valeur prédictive quelque soit la technique utilisée

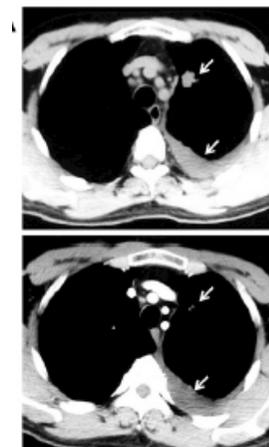
Quelle valeur prédictive pour les translocations mises en évidence par PCR digitale ?

N= 103, 14 patients FISH +, 13 confirmés en ddPCR (1 cas avec KIF5B-ALK)
 16 patients FISH -, avec faible nombre de copies de EML4-ALK

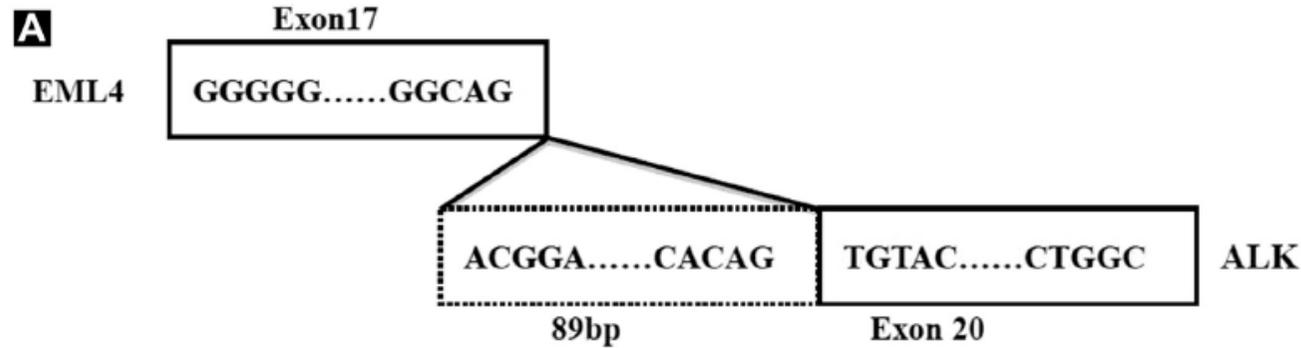


2 patients traités par crizotinib: PFS de 7 et 5 mois
 ddPCR 0,011 (FISH 10%)
 ddPCR 0,009% (FISH 8%)

Sensibilité ddPCR: 0,001%

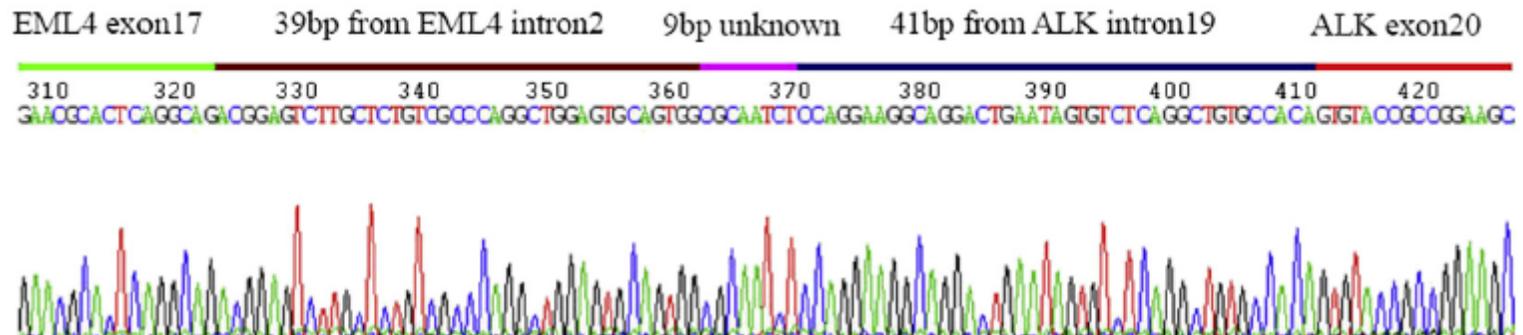


RT-PCR et détection de nouveaux variants

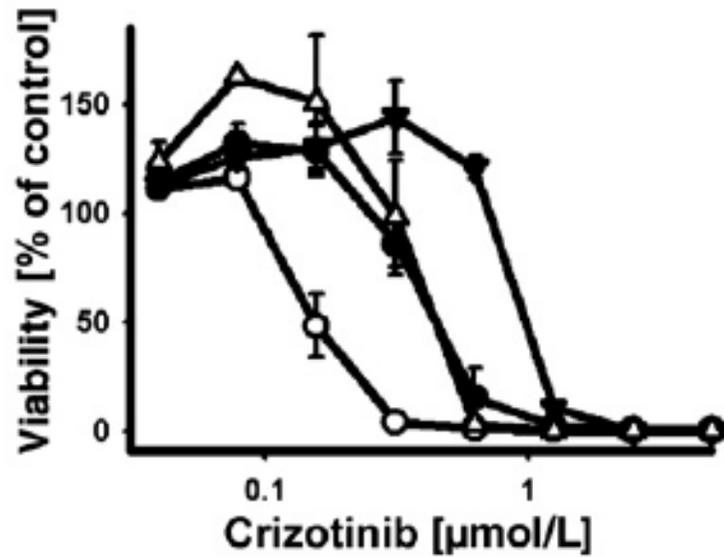


```

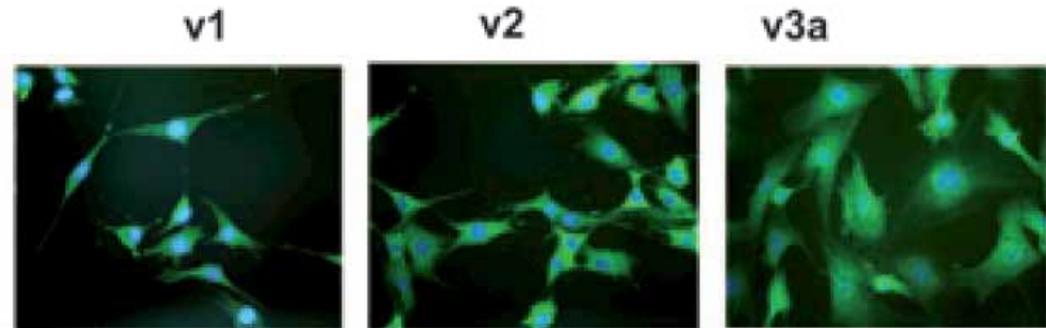
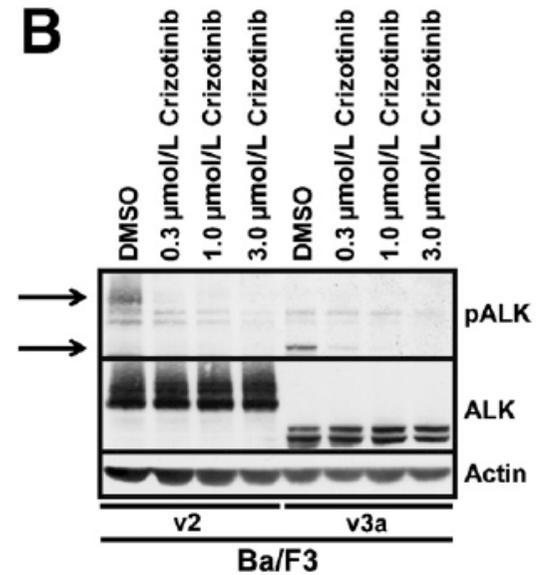
GGGGGGGGGGGGGGGGCACAATCAGAGCTGTAGCAGAAGGAAAGGCAGATCAATTTTTAGTAGGCACAT
CACGAAACTTTAATTTTACGAGGAACAATTAATGATGGCTTCCAAATAGAAGTACAGGGTCATACAGATG
AGCTTTGGGGTCTTGCCACACATCCCTTCAAAGATTTGCTCTTGACATGTGCTCAGGACAGGCAGGTG
TGCCTGTGGAACTCAATGGAACACAGGCTGGAATGGACCAGGCTGGTAGATGAACCAGGACACTGTG
CAGATTTTCATCCAAGTGGCACAGTGGTGGCCATAGGAACGCCTCAGGCAGACGGAGTCTTGCTCTG
TCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCAATCTCCAGGAAGGCAGGACTGAATAGTGTCTCAGGCTGTG
CCACAGTGTACCGCCGGAAGCACCAGGAGCTGCAAGCCATGCAGTTGGAGCTGCAGAGCCCTGAGTA
CAAGGGGGGGCAAGCTCCGCACCTCGACCATCATGACCGACTACAACCCCAACTACGCTGGC
    
```



Variants et valeur prédictive



- EML4-ALK v1 ○ EML4-ALK v2
- ▼ EML4-ALK v3a △ EML4-ALK v3b

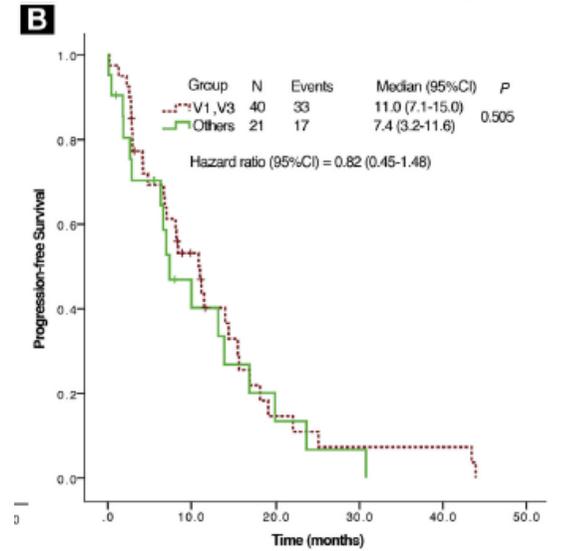
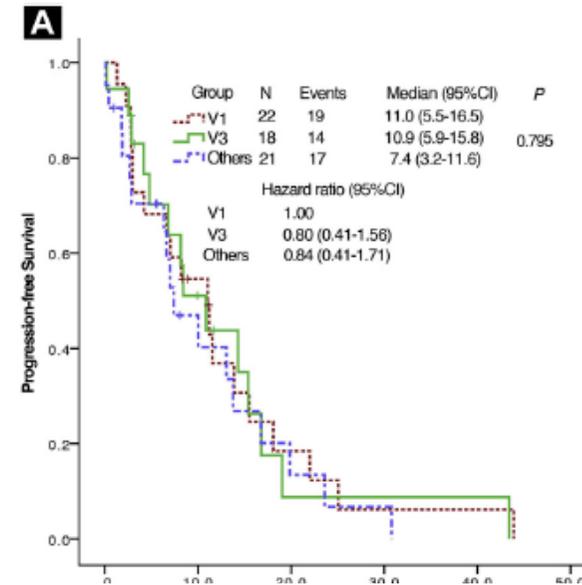
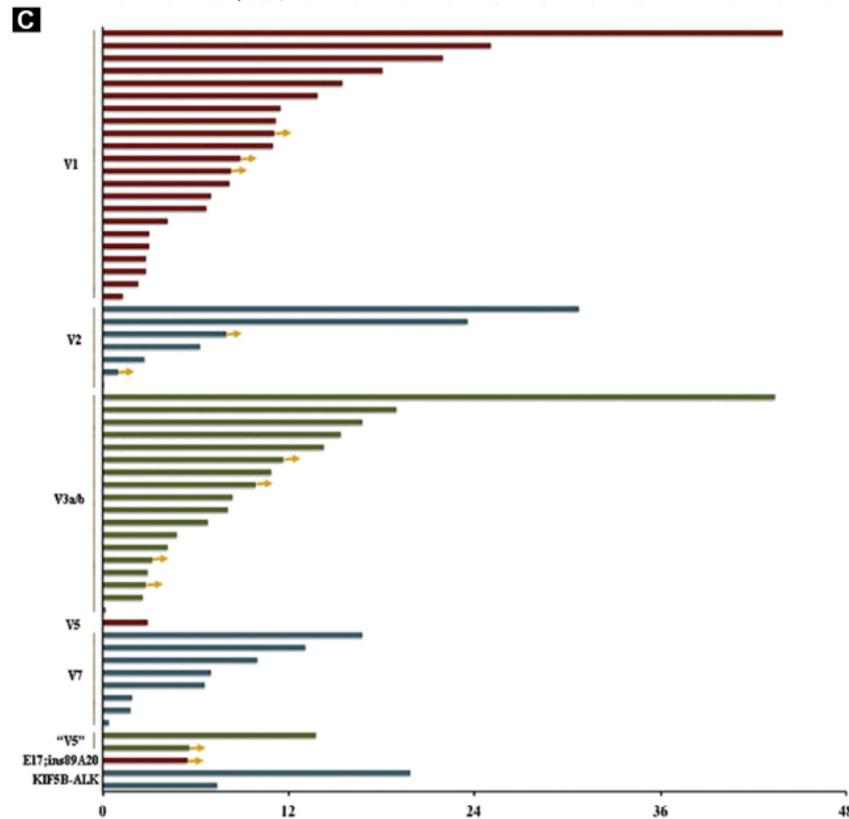


Variants et valeur prédictive aux ITK-ALK

n= 120 patients ALK réarrangés traités par crizotinib

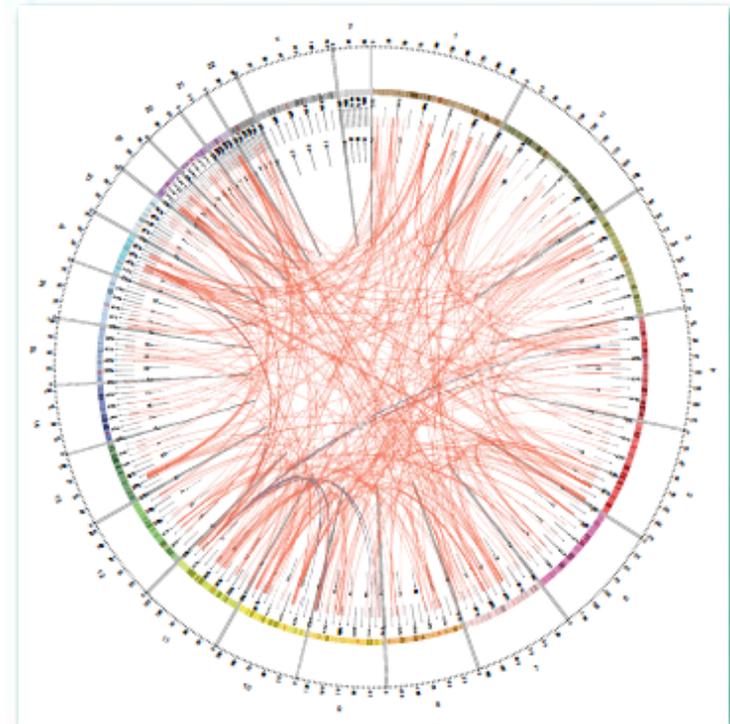
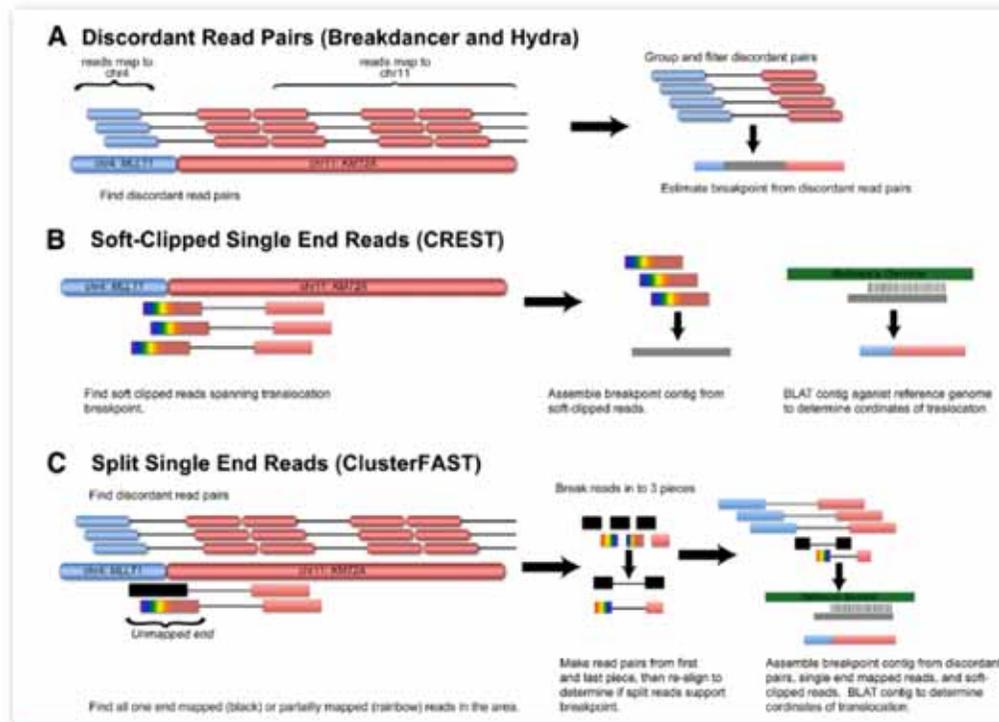
63 testés en RT-PCR

114 en FISH



Par NGS

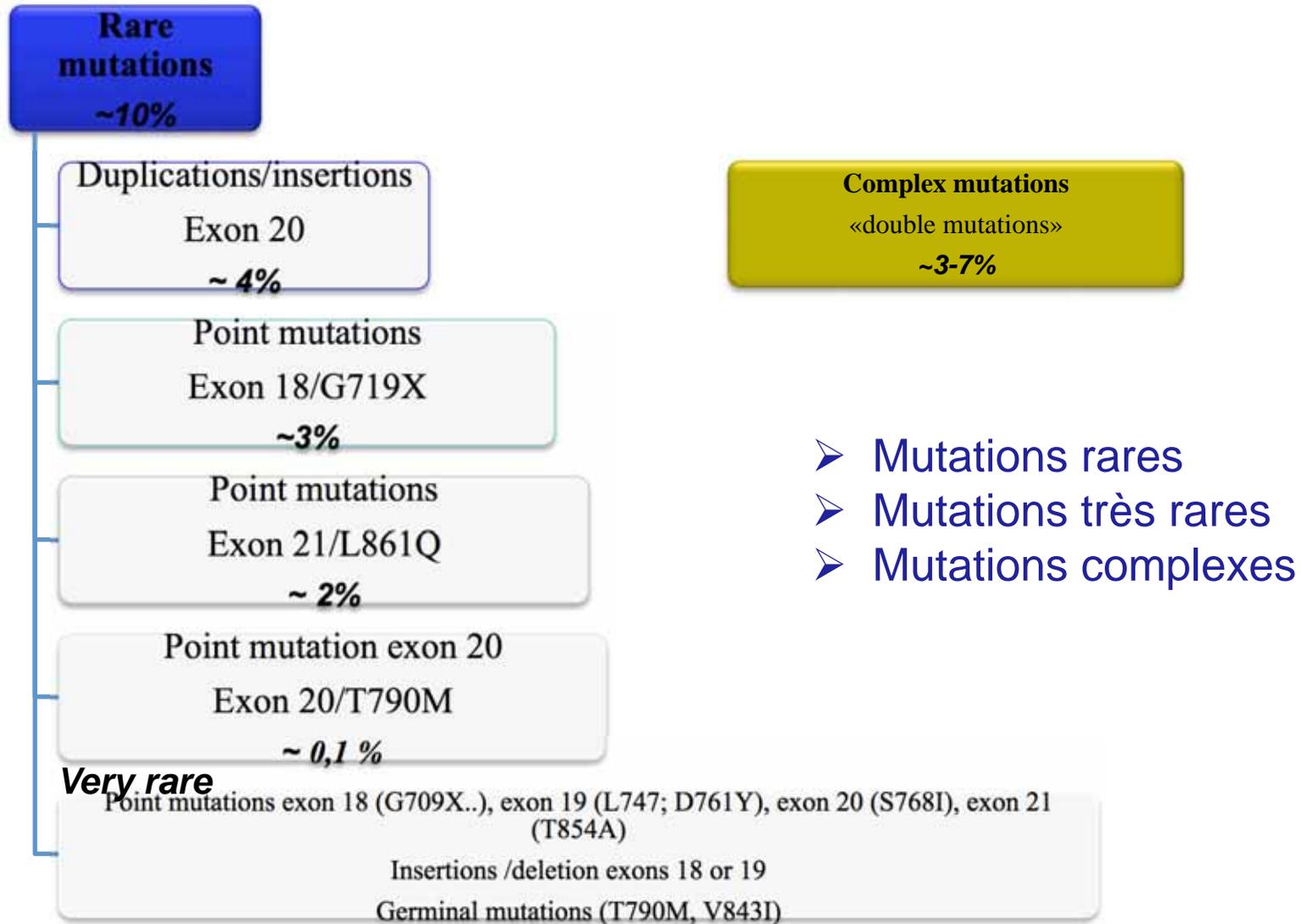
- Réalisation des « bibliothèques » par capture, panels différents pour l' oncogène et ses différents partenaires
- Différents algorithmes bio-informatiques



- Sensibilité identique à la FISH
- Identification de nouveaux variants

- Introduction
- Quel échantillon analyser?
- Quels critères de qualité de l'échantillon?
- Les techniques de biologie moléculaire
- Le futur proche
- La recherche des translocations
- **L'interprétation des résultats**

Les mutations rares, non-communes, d' EGFR



La sensibilités aux ITK-EGFR

Cohorte française

	Patients, <i>n</i> (%)	Patients with exon 18 <i>EGFR</i> mutations, <i>n</i> (%)	Patients with exon 20 <i>EGFR</i> mutations, <i>n</i> (%)	Patients with complex exon 18 and exon 20 <i>EGFR</i> mutations, <i>n</i> (%)
EGFR-TKI usage, erlotinib/gefitinib	50	18	25	7
First-line	11 (22)	1 (6)	9 (36)	1 (14)
Second-line	33 (66)	13 (72)	15 (60)	5 (72)
Third-line	4 (8)	2 (11)	1 (4)	1 (14)
Upper	2 (4)	2 (11)	0 (0)	0 (0)
Best response to EGFR-TKI				
PR	7 (15)	1 (7)	2 (8)	4 (57)**
SD	15 (32)	4 (27)	9 (36)	2 (29)***
PD	25 (53)	10 (66)	14 (56)	1 (14)
MD	3	3	0	0
Progression-free survival (months), median (95% CI)	4 (2-not estimated)	3 (1-not estimated),	2 (1-not estimated)	not reached,
<3 months	22 (48)	6 (43)	16 (64)	0 (0)
≥3, <6 months	13 (28)	5 (36)	4 (16)	4 (57)
≥6 months	11 (24)	3 (21)	5 (20)	3 (43)
Unknown	4	4	0	0
Overall survival from EGFR- TKI (months), median (95% CI)	14 (6-21)	22 (1-44)	9.5 (4-15)	14 (5-23)

Toutes les mutations EGFR mutations n'ont pas la même sensibilité aux ITK-EGFR

EGFR TKI efficacy in rare and complex mutations

No. of patients		EGFR mutation	RR (%)	PFS (mo)	OS (mo)
278		Single classical mutation (deletions in exon 19 or L858R)	74.1	8.5	19.6
Gefitinib, n=60; Erlotinib, n=11					
11	Exon 20	Insertions in exon 20	0	1.4	4.8
15	Exon 18	G719 (single or complex)	53.3	8.1	16.4
15	Exon 21	L861 (single or complex)	60.0	6.0	15.2
20	Complex	Uncommon mutations with combination with deletions in exon 19 or L858R	60.0	5.3	18.8
15	Complex	Uncommon mutations without combination with deletions in exon 19 or L858R or G719 or L861	20.0	1.6	11.1

Résistance aux ITK 3 ème génération

- Mutation EGFR C797X (domaine TK)
- Amplification HER2
- Amplification cMET

- Perte totale de la mutation T790M

- Tumeur primitive *versus* métastase: différents profils moléculaires

Biologie moléculaire et résistance aux ITK-ALK

Mécanismes dépendants d' ALK: mutations et amplifications

Crizotinib	Alectinib	Ceritinib
L1196M [28]	I1171N/S/T [32, 34, 35]	C1156Y [36]
C1156Y [28]	G1202R [33]	F1174C/V [36]
G1269A [40]	V1180L [34]	1151Tins? [15, 36]
F1174L [56]		L1152R [36]
1151Tins [37]		G1202R [36]
L1152R [57]		G1123S [38]
S1206Y [37]		
I1171T [32, 34]		
V1180L [34]		
D1203N [39]		
G1202R [37]		

Biologie moléculaire et résistance aux ITK-ALK

Mécanismes indépendants d' ALK

Crizotinib resistance

Secondary mutations in the *ALK* gene [e.g. 21]

ALK CNG [40]

EGFR mutation [40]

KRAS mutation [40]

activation of ErbB family [37]

amplification of *KIT* [37]

activation of IGF-1R pathway [41]

EGFR ligands [42]

hypoxia-induced EMT [43]

autophagy [44]

Alectinib resistance

Secondary mutations in the *ALK* gene [32–35]

EGFR ligands [48]

HGF/*MET* signaling pathway (*MET* amplification) [47–49]

hypoxia-induced EMT [43]

Ceritinib resistance

Secondary mutations in the *ALK* gene [36, 38]

Rendu de résultat NGS ciblé somatique

BIOLOGIE MOLECULAIRE

Compte-rendu d'analyse somatique par NGS (32 gènes)

Identité : Mme. F. [REDACTED] C. [REDACTED] Organe : Endomètre

Née le : [REDACTED] 1943 Type histologique : Adénocarcinome papillaire séreux

Adresse : [REDACTED] Identifiant laboratoire : [REDACTED]

N° dossier : [REDACTED] Demandeur : [REDACTED]

Date d'analyse : 03.07.2014 Double : [REDACTED]

Résultats

Gènes	Variation nucléotidique	Variation protéique	Impact
<i>JAK3</i>	c.1714G>A	p.A572T	Mutation activatrice
<i>KDR</i> (<i>VEGFR2</i>)	c.1416A>T	p.Q472H	SNP induisant un gain de fonction
<i>KRAS</i>	c.183A>C	p.Q61H	Mutation activatrice
<i>PTEN</i>	c.755A>T	p.D252V	Mutation d'effet inconnu dans le domaine C2

Conclusion

Parmi les 116 exons analysés sur 32 gènes, 3 mutations ont été détectées : 2 mutations activatrices (*JAK3* et *KRAS*) et 1 mutation d'effet inconnu du gène *PTEN*.

La mutation activatrice de *JAK3* sensibilise aux inhibiteurs de *JAK3*. La mutation du gène *PTEN*, vu sa localisation, pourrait sensibiliser aux inhibiteurs de *PARP* (olaparib), aux inhibiteurs de *PI3K* et aux inhibiteurs de *mTOR*.

La présence du SNP Q472H du gène *KDR* est décrite comme induisant un gain de fonction de la protéine.

Conclusion - Perspectives

- Des technologies en pleine mutation
- Des compte-rendus de résultats complexes
- Le monitoring moléculaire
- La prédiction de la résistance

