



# Du transfert en clinique des techniques moléculaires à haut débit aux prescriptions hors AMM

Pr Alexis Cortot

Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, CHRU Lille

Institut de Biologie de Lille

Cours du GOLF, Paris, 10 octobre 2018

## Liens d'intérêt

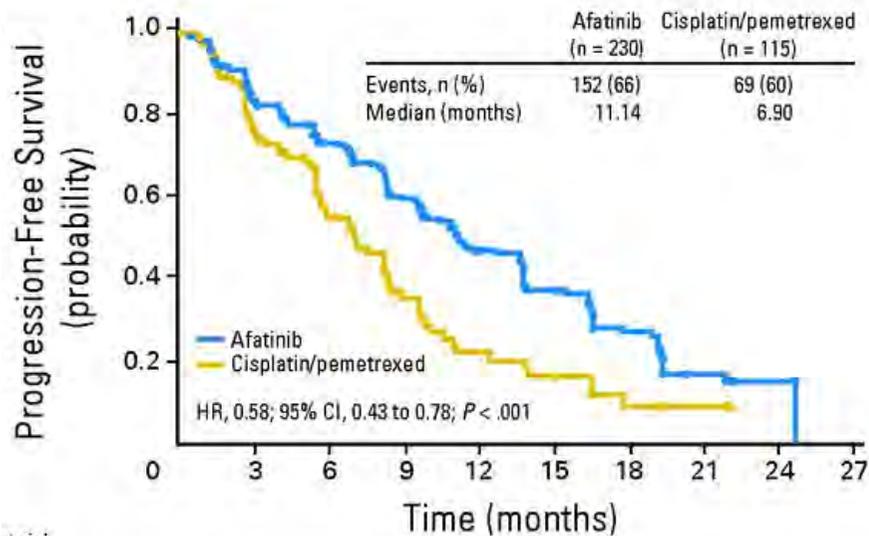
- Activité de conseil ou honoraires au cours des deux dernières années pour les sociétés suivantes : Astra-Zeneca, Boehringer-Ingelheim, BMS, Merck, MSD, Novartis, Pfizer, Takeda

# Principe de la médecine de précision

- Cibler les mécanismes responsables de la croissance tumorale peut améliorer le pronostic des patients
- Ces mécanismes sont *individuels*
- Objectif : identifier les mécanismes de carcinogenèse à l'échelle individuelle afin de proposer un ciblage thérapeutique optimal

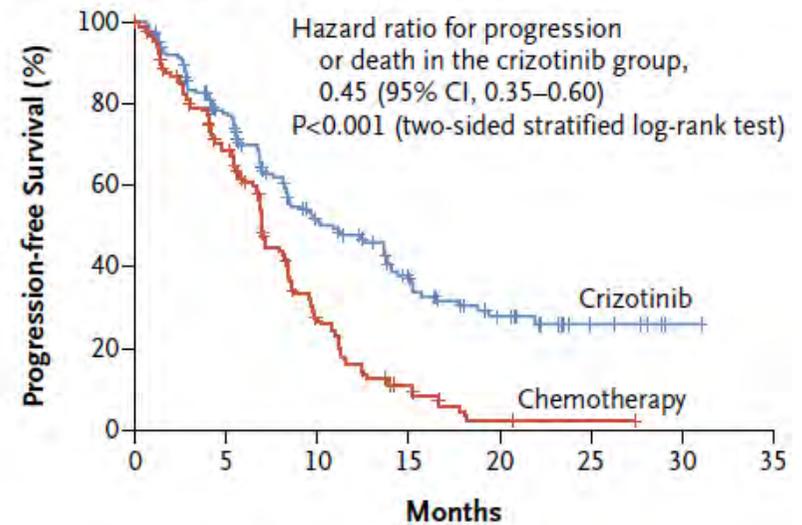
# Les succès de la médecine de précision

## Mutation EGFR



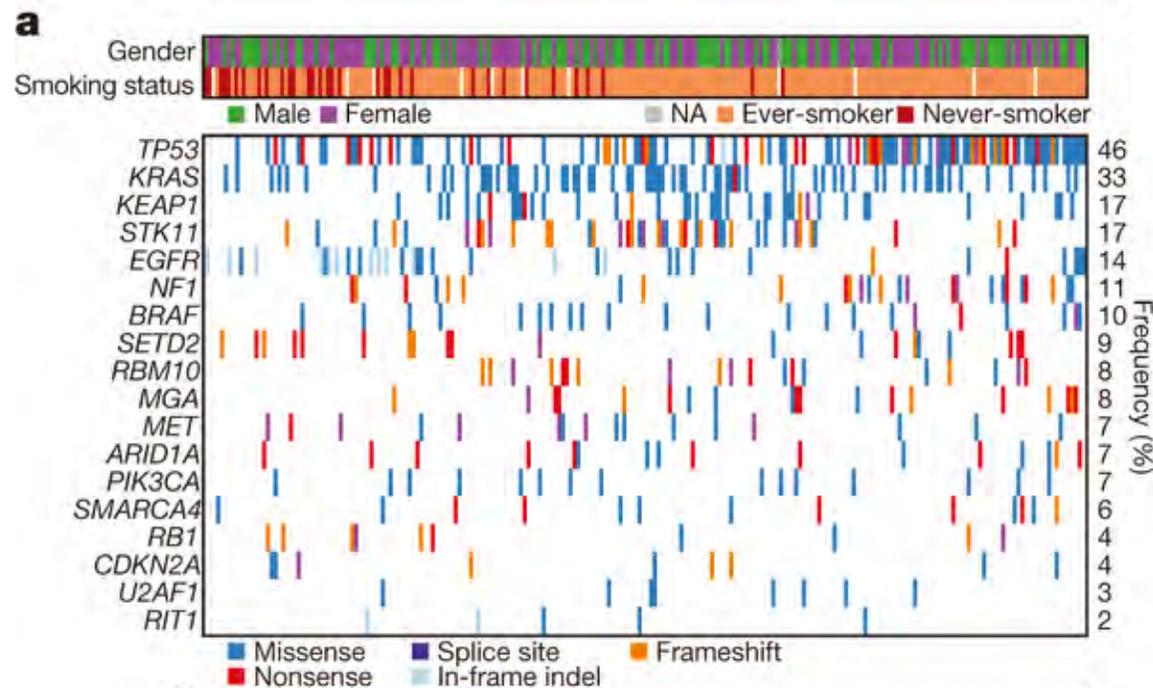
## Réarrangement ALK

### Progression-free Survival

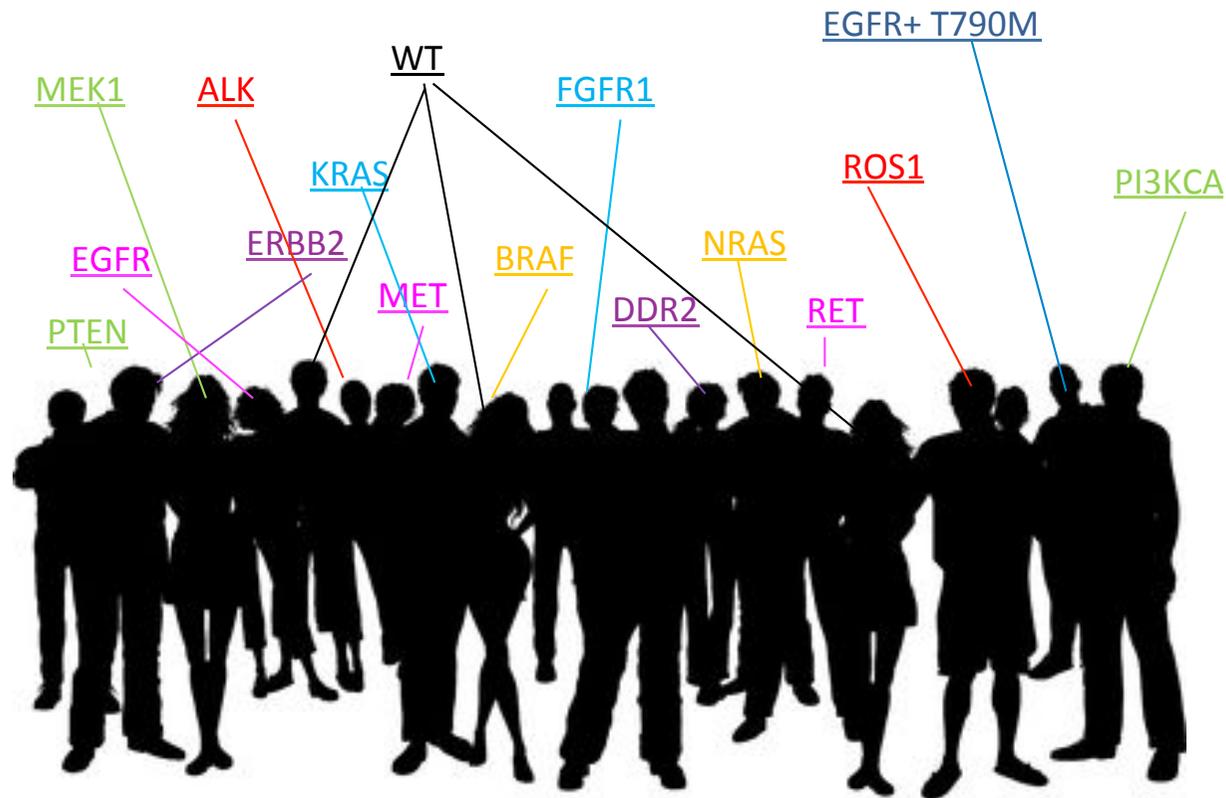


# Les succès de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?



# Cancérologie moderne : une cible pour tous



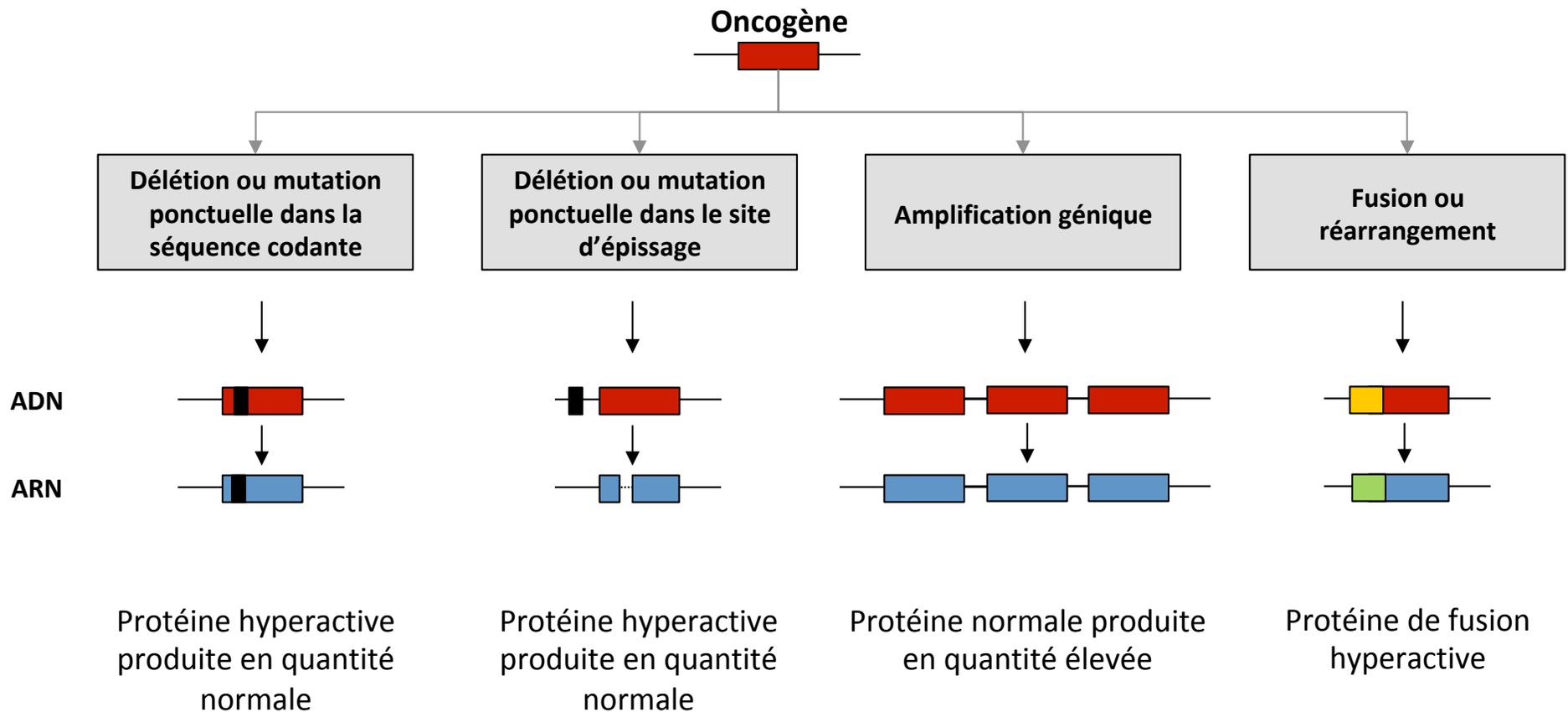
# Développement de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?
  1. Identifier les altérations d'intérêt
  2. Déterminer in vitro/in vivo les traitements actifs en présence de cette altération
  3. Mettre en place les tests permettant de rechercher cette altération
  4. Favoriser l'accès au traitement et confirmer son efficacité

# Développement de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?
  1. Identifier les altérations d'intérêt
  2. Déterminer in vitro/in vivo les traitements actifs en présence de cette altération
  3. Mettre en place les tests permettant de rechercher cette altération
  4. Favoriser l'accès au traitement et confirmer son efficacité

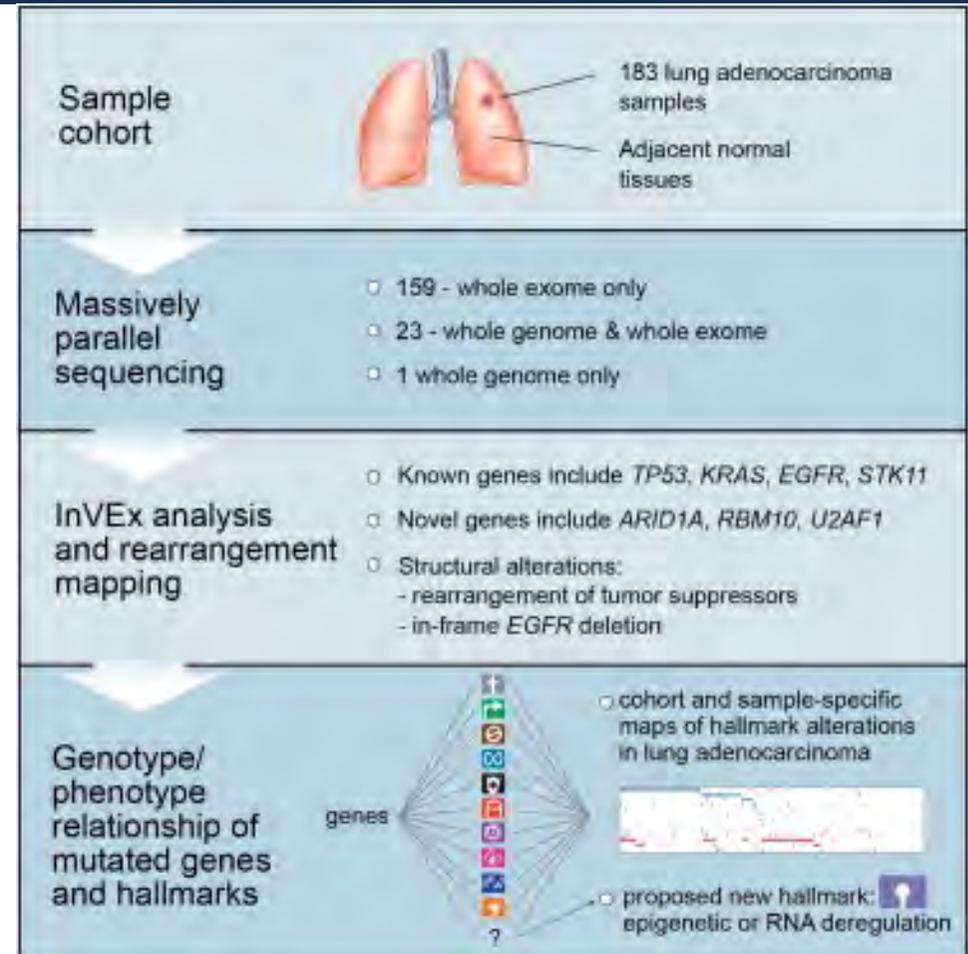
# Le cancer est une maladie du génome



# Identifier de nouvelles cibles

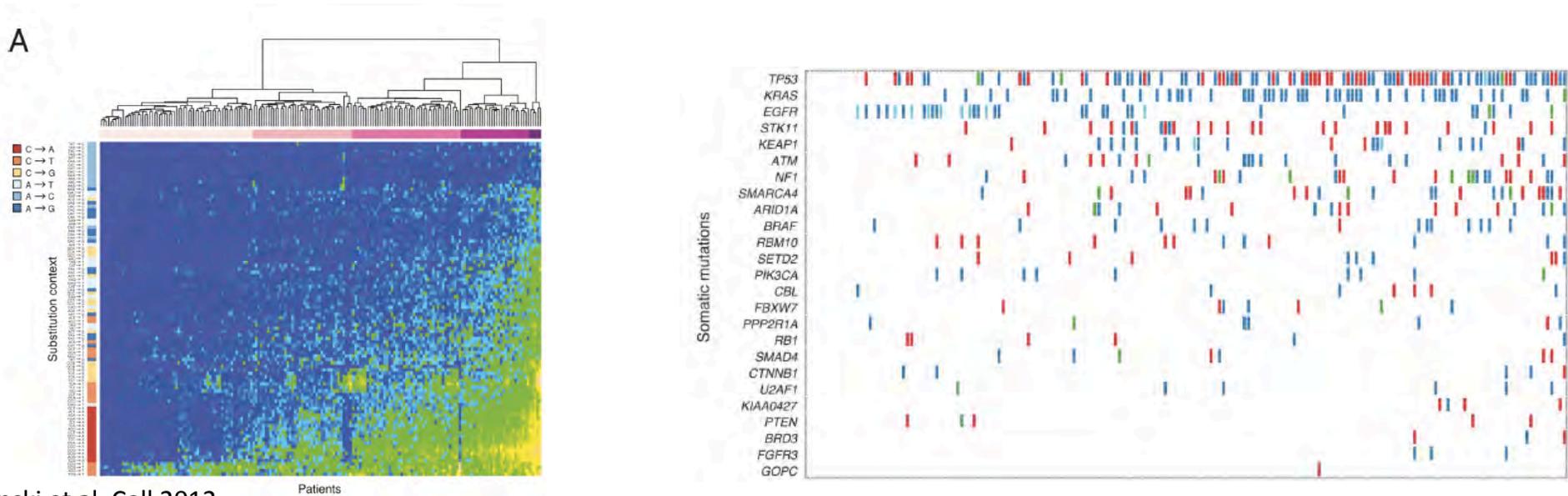
Comment identifier de nouvelles cibles?

Programmes de recherche dédiés



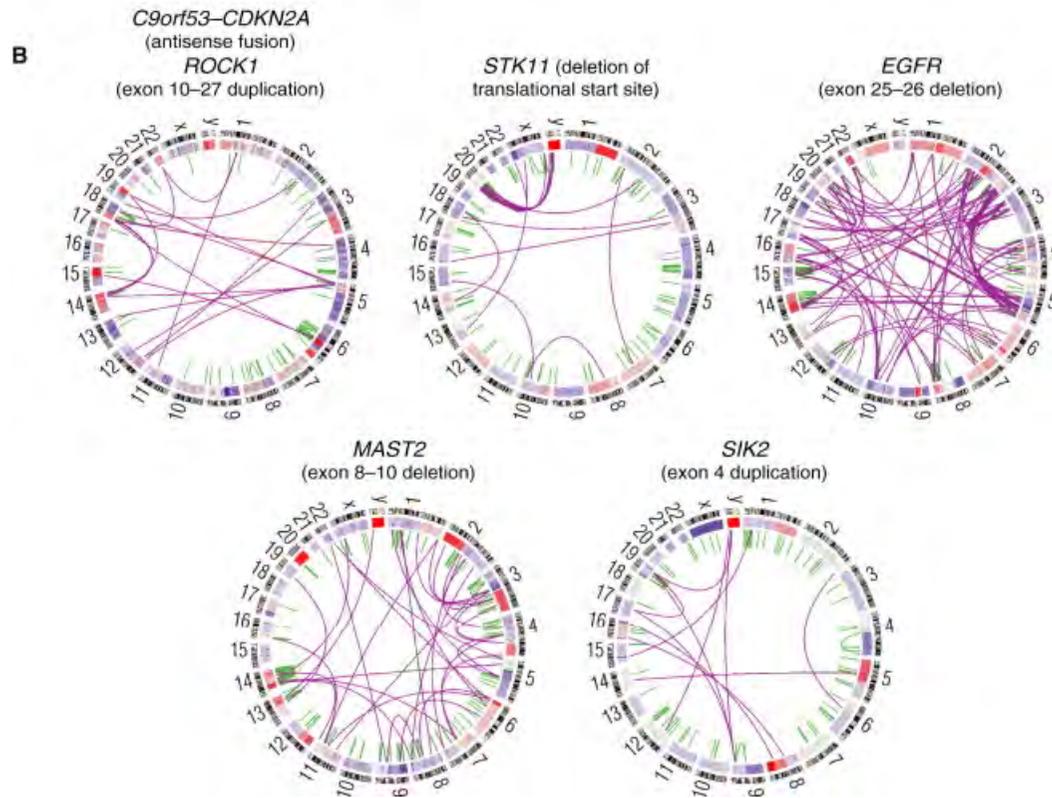
# Identifier de nouvelles cibles

- De nombreuses mutations sont détectées dans l'ADN d'un adénocarcinome pulmonaire
- Distinguer les mutations non silencieuses (qui entraînent une modification de l'ARN et de la protéine) des mutations silencieuses
- Limiter l'analyse aux gènes d'intérêt (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs)



# Identifier de nouvelles cibles

- Recherche d'amplifications (CGH)
- Recherche de réarrangements (RNAseq)



# Identifier de nouvelles cibles

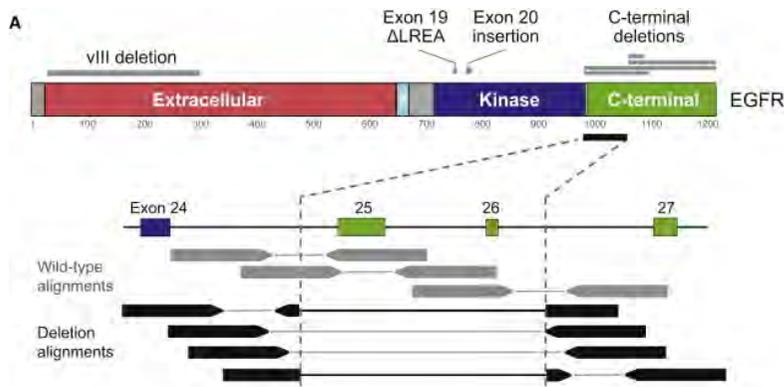
**Table 1. Recurrent Molecular Alterations in Lung Adenocarcinoma, Squamous-Cell Carcinoma, and Small-Cell Carcinoma.\***

| Type of Alteration        | Adenocarcinoma   | Squamous-Cell Carcinoma   | Small-Cell Carcinoma  |
|---------------------------|--|---|---|
| Cell-cycle mutations      | <i>TP53</i> (46%), <i>CDKN2A</i> (4%)  | <i>TP53</i> (91%), <i>CDKN2A</i> (17%), <i>RB1</i> (7%)   | <i>TP53</i> (92%), <i>RB1</i> (75%)   |
|                           | <i>RTK/PI3K-MTOR</i> signaling<br><i>KRAS</i> (33%), <i>EGFR</i> (14%), <i>BRAF</i> (10%), <i>STK11</i> (17%), <i>MET</i> (8%), <i>NF1</i> (11%), <i>PIK3CA</i> (7%), <i>RIT1</i> (2%) | <i>RTK/PI3K-MTOR</i> signaling<br><i>PIK3CA</i> (16%), <i>PTEN</i> (8%), <i>HRAS</i> (3%)   | <i>RTK/PI3K-MTOR</i> signaling: <i>PTEN</i> (5%)  |
| Other mutations           | Oxidative stress response: <i>KEAP1</i> (17%), <i>MYC</i> pathway; <i>MGA</i> (8%)<br><br>Aberrant splicing: <i>U2AF1</i> (3%), <i>RBM10</i> (8%)                                      | Oxidative stress response: <i>CUL3</i> (6%), <i>KEAP1</i> (12%), <i>NFE2L2</i> (15%)<br><br>Squamous differentiation: <i>NOTCH1</i> (8%), <i>ASCL4</i> (3%), <i>NOTCH2</i> (5%) | Epigenetic deregulation: <i>EP300</i> (11%), <i>CREBBP</i> (10%)<br><br>Neuroendocrine differentiation: <i>NOTCH1</i> (15%), <i>NOTCH2</i> (5%), and <i>NOTCH3</i> (9%) |
| Rearrangements            | <i>ALK</i> (3–8%), <i>ROS1</i> (2%), <i>RET</i> (1%), <i>NTRK1</i> (3%), <i>NRG1</i> (2%), <i>BRAF</i> (3% in those who never smoked), <i>ERBB4</i> (1%)                               | <i>FGFRs</i> (rare)   | <i>RB1</i> (13%), <i>TP73</i> (7%), <i>CREBBP</i> (4%), <i>PTEN</i> (4%), <i>RBL1</i> (3%)  |
| Amplifications            | <i>TTF1</i> (14%), <i>TERT</i> (18%), <i>EGFR</i> (7%), <i>MET</i> (4%), <i>KRAS</i> (6%), <i>ERBB2</i> (3%), <i>MDM2</i> (8%)   | Chr3q: <i>SOX2</i> (43%), <i>TP63</i> (29%), <i>PIK3CA</i> (38%), <i>HES1</i> (26%) <sup>†</sup>  | <i>MYC</i> family members (16%): <i>MYC</i> , <i>MYCN</i> , <i>MYCL1</i> , <i>SOX2</i> (27%), <i>FGFR1</i> (8%), <i>IRS2</i> (2%)                                       |
| Deletions                 | <i>CDKN2A</i> (20%)  | <i>CDKN2A</i> (27%), <i>PTEN</i> (3%)   | <i>TP53</i> , <i>RB1</i> , <i>CDKN2A</i> , Chr3p (e.g., <i>FHIT</i> , <i>ROBO1</i> ) <sup>†</sup>   |
| Commonly altered pathways | <i>MAPK</i> and <i>PI3K</i> signaling, oxidative stress response, cell-cycle progression, RNA splicing and processing, nucleosome remodeling   | Squamous-cell differentiation, oxidative stress response, <i>MAPK</i> and <i>PI3K</i> signaling   | Cell-cycle regulation, <i>PI3K</i> signaling, regulation of nucleosome transcriptional and remodeling, <i>NOTCH</i> signaling and neuroendocrine differentiation        |

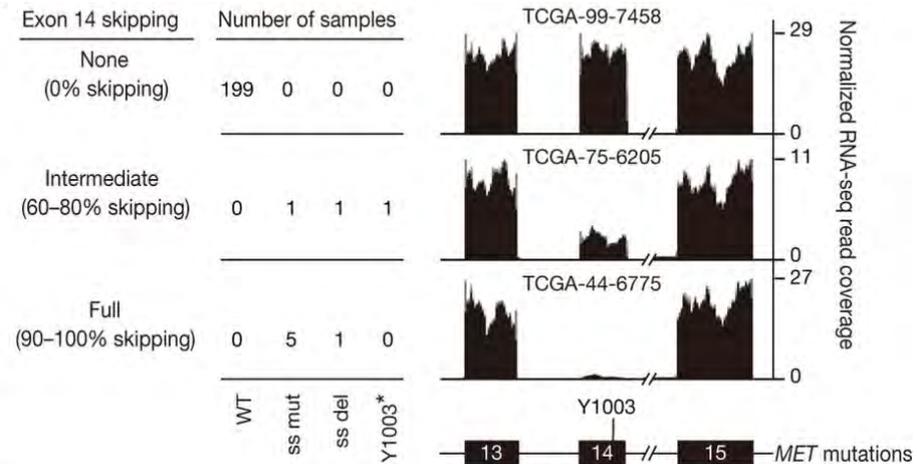
# Identifier de nouvelles cibles

- De nouvelles altérations sont encore régulièrement identifiées
- Mutations plus rares ou de mécanisme plus complexe
- Quelle est la pertinence clinique d'une mutation?

## Délétions rares EGFR



## Saut d'exon 14 de MET dû à une mutation des sites d'épissage



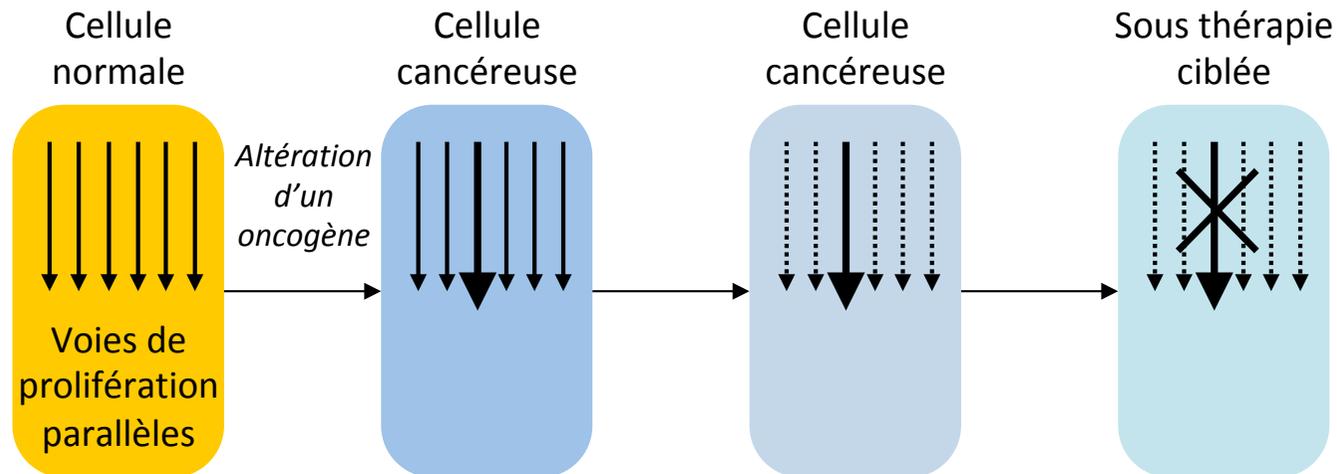
Imielinski et al. Cell 2012; TCGA Nature 2014

# Développement de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?
  1. Identifier les altérations d'intérêt
  2. Déterminer in vitro/in vivo les traitements actifs en présence de cette altération
  3. Mettre en place les tests permettant de rechercher cette altération
  4. Favoriser l'accès au traitement et confirmer son efficacité

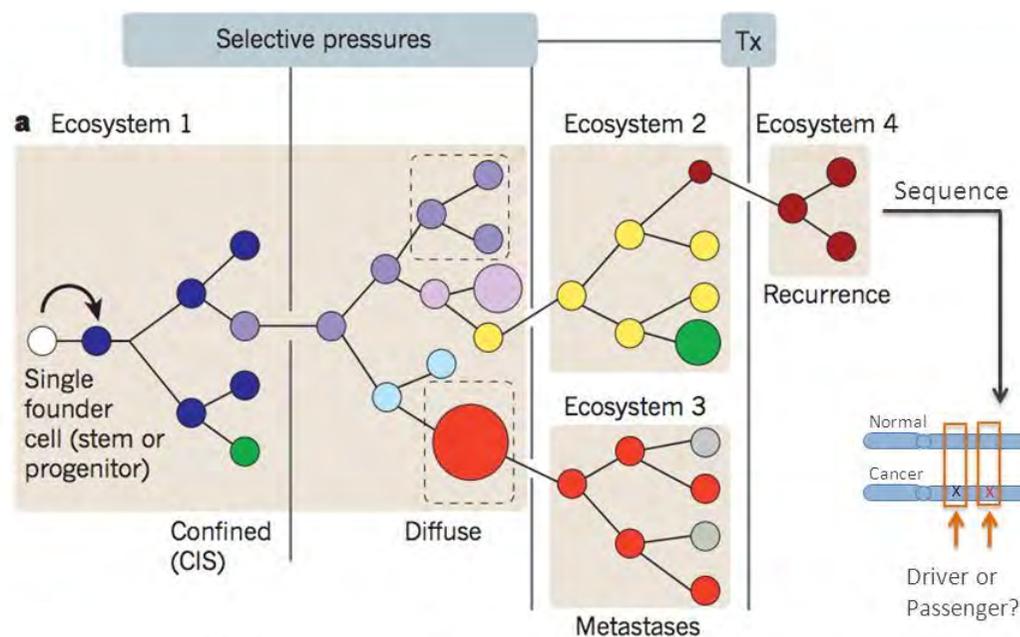
# La cible est-elle accessible à un traitement?

- Pertinence clinique = mutation associée à une thérapie ciblée
  - Nécessité d'analyses fonctionnelles in vitro/in vivo
  - Recherche d'un phénomène **d'addiction oncogénique**
  - Identifier le « talon d'Achille » de la cellule cancéreuse



# La cible est-elle accessible à un traitement?

- Distinguer les mutations « drivers » des mutations « passagers »
- Les mutations drivers confèrent un avantage prolifératif
- Les mutations passagers ont peu/pas de conséquences fonctionnelles



Greaves et Maley, Nature 2012

Une mutation peut refléter :

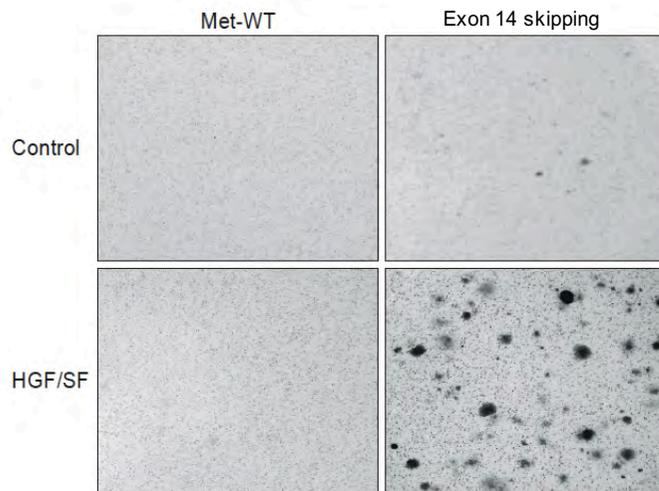
- Événement à l'origine de la survenue du cancer
- Événement ayant permis au cancer de devenir invasif
- Événement ayant permis au cancer de métastaser
- Événement ayant permis au cancer de résister au traitement
- Événement sans conséquence, lié à l'instabilité génomique de la cellule cancéreuse
- ...

# La cible est-elle accessible à un traitement?

- Utilisation de bases de données / analyse littérature
- Tests fonctionnels pour déterminer la pertinence de l'altération

## Mutations des sites d'épissage de l'exon 14 de MET

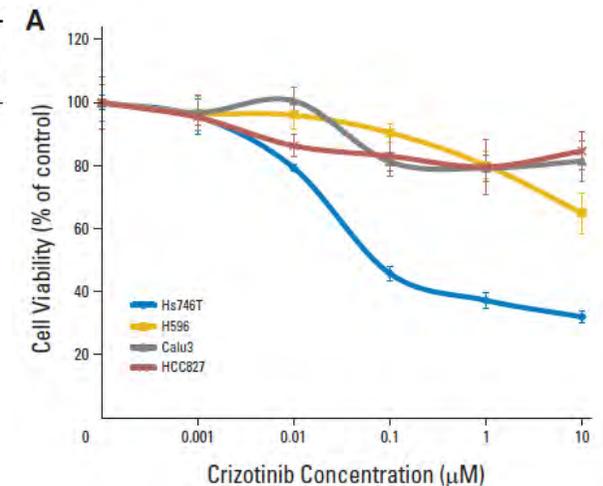
### Formation de colonies (NIH3T3)



### Formation de tumeurs chez la souris

| Met construct    | No. mice with tumors/<br>No. mice injected <sup>a</sup> | Mean tumor size,<br>mm <sup>2</sup> (mean ± S.D.) <sup>b</sup> |
|------------------|---|--|
| WT               | 0/6 <sup>c</sup>  | 0  |
| Exon 14 skipping | 6/6 (10)  | 57.8 ± 9.1   |

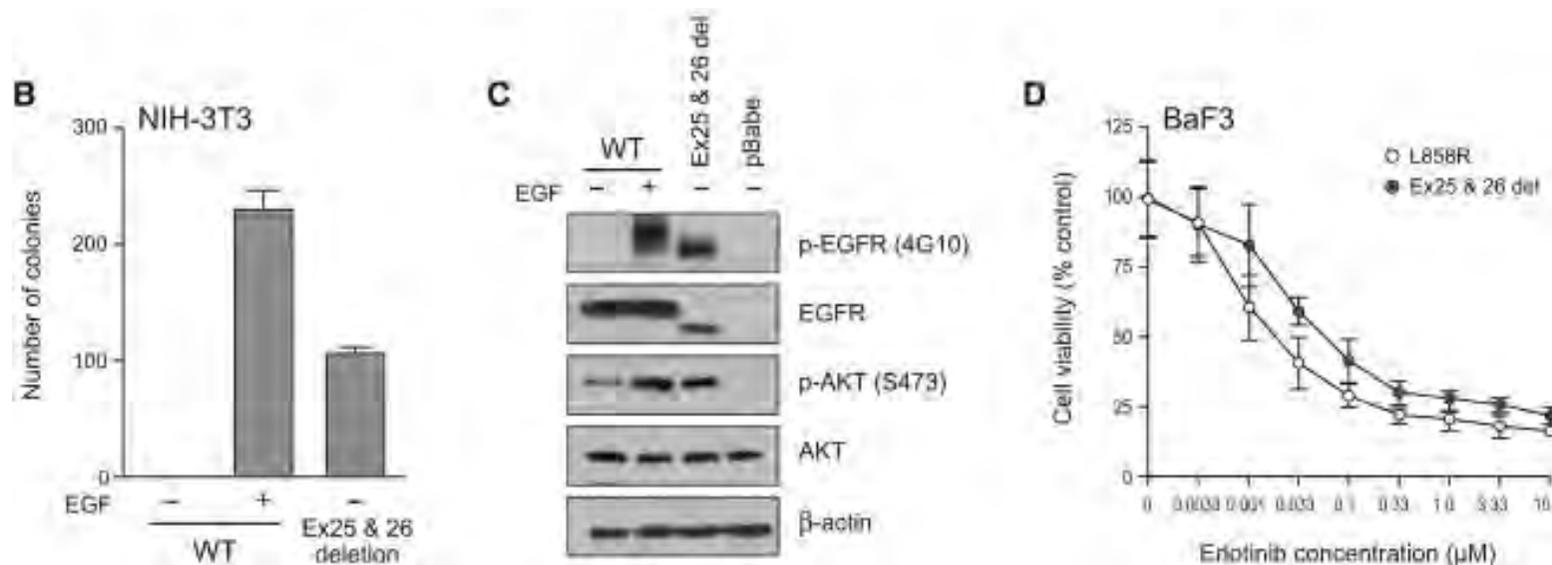
### Sensibilité aux TKI



# La cible est-elle accessible à un traitement?

- Déterminer s'il existe des traitements actifs en présence d'une altération moléculaire donnée

## Délétions rares EGFR



# La cible est-elle accessible à un traitement?

- Déterminer s'il existe des traitements actifs en présence d'une altération moléculaire donnée

## Mutations KRAS





# La cible est-elle accessible à un traitement?

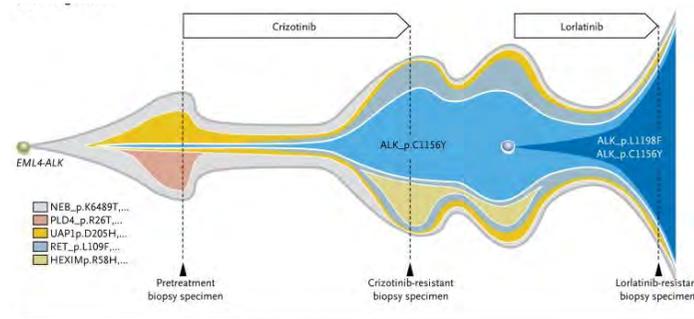
- Challenge : développement d'unités de recherche translationnelle pour déterminer la pertinence d'une cible/ d'un mécanisme de résistance

*Patiente 45 ans, adk ALK+*

*Progression après crizotinib, céritinib (G1202R),*

*lorlatinib*

*Mutation complexe G1202R + G1269A...?*

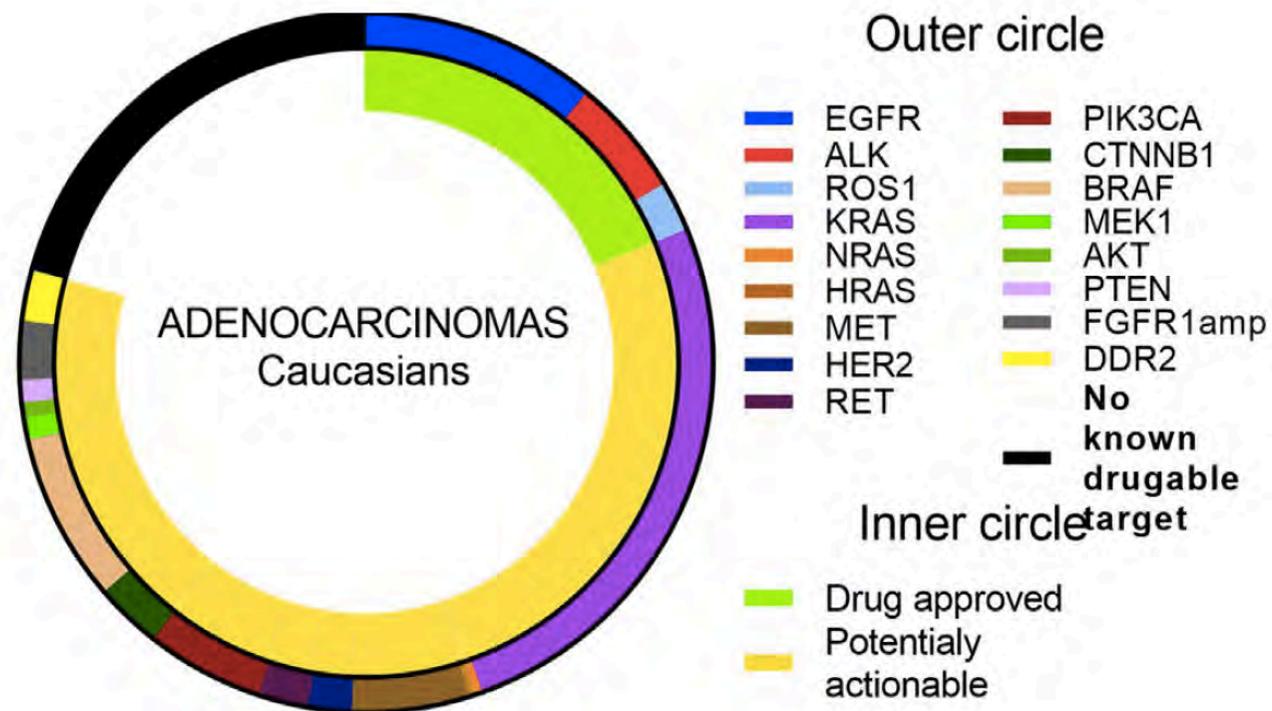


| Mutation status        | Cellular ALK Phosphorylation Mean IC50 (nM) |                   |                   |            |            |
|------------------------|---|-------------------|-------------------|------------|------------|
|                        | Crizotinib                                  | Ceritinib         | Alectinib         | Brigatinib | Lorlatinib |
| Parental Ba/F3         | 763.9                                       | 885.7             | 890.1             | 2774.0     | 11293.8    |
| EML4-ALK V1            | 38.6  | 4.9               | 11.4              | 10.7       | 2.3        |
| EML4-ALK C1156Y        | 61.9  | 5.3               | 11.6              | 4.5        | 4.6        |
| EML4-ALK I1171N        | 130.1                                       | 8.2               | 397.7             | 26.1       | 49.0       |
| EML4-ALK I1171S        | 94.1  | 3.8               | 177.0             | 17.8       | 30.4       |
| EML4-ALK I1171T        | 51.4  | 1.7               | 33.6 <sup>a</sup> | 6.1        | 11.5       |
| EML4-ALK F1174C        | 115.0                                       | 38.0 <sup>a</sup> | 27.0              | 18.0       | 8.0        |
| EML4-ALK L1196M        | 339.0                                       | 9.3               | 117.6             | 26.5       | 34.0       |
| EML4-ALK L1198F        | 0.4   | 196.2             | 42.3              | 13.9       | 14.8       |
| EML4-ALK G1202R        | 381.6                                       | 124.4             | 706.6             | 129.5      | 49.9       |
| EML4-ALK G1202del      | 58.4  | 50.1              | 58.8              | 95.8       | 5.2        |
| EML4-ALK D1203N        | 116.3                                       | 35.3              | 27.9              | 34.6       | 11.1       |
| EML4-ALK E1210K        | 42.8  | 5.8               | 31.6              | 24.0       | 1.7        |
| EML4-ALK G1269A        | 117.0                                       | 0.4               | 25.0              | ND         | 10.0       |
| EML4-ALK D1203N+F1174C | 338.8                                       | 237.8             | 75.1              | 123.4      | 69.8       |

IC50 ≤ 50 nM  
 IC50 > 50 < 200 nM  
 IC50 ≥ 200 nM

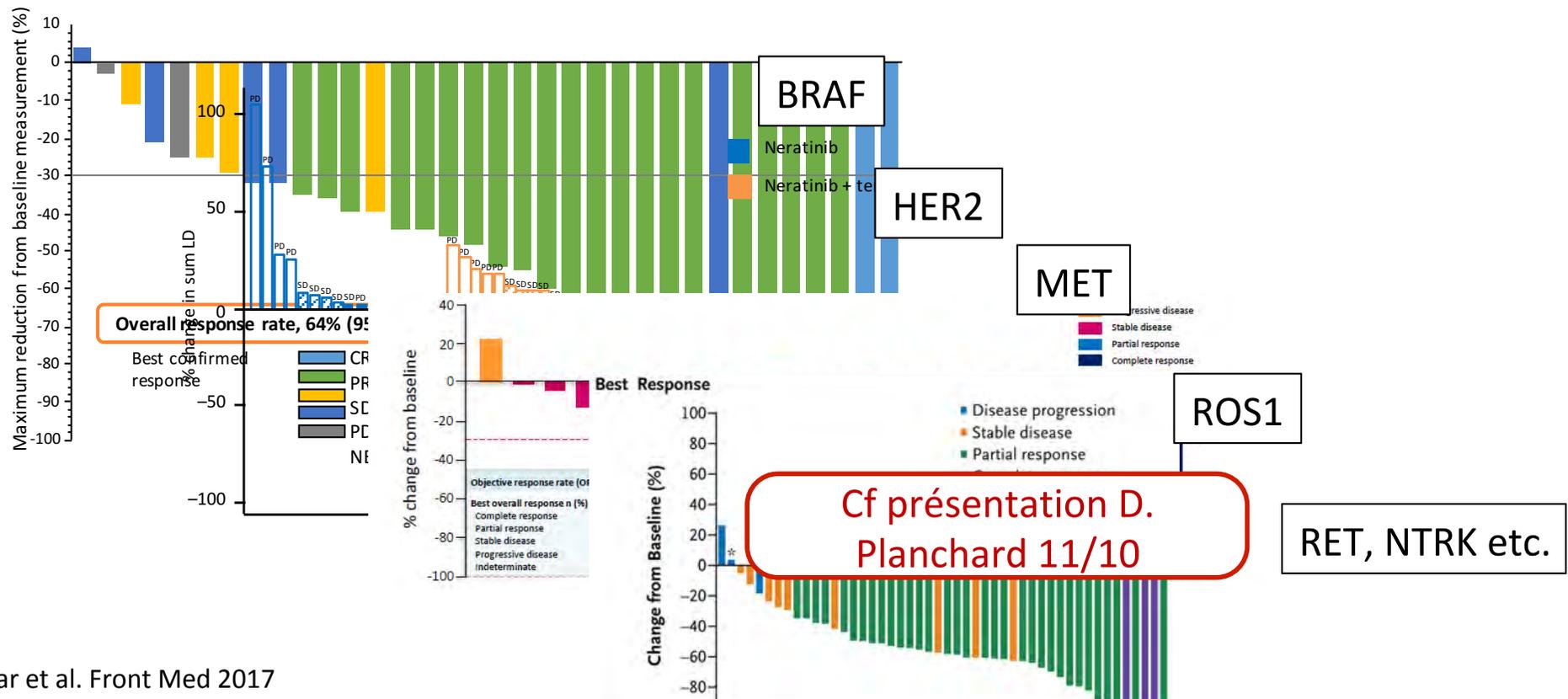
# La cible est-elle accessible à un traitement?

- Cibles potentiellement accessibles à une thérapie ciblée



# La cible est-elle accessible à un traitement?

- Cibles potentiellement accessibles à une thérapie ciblée

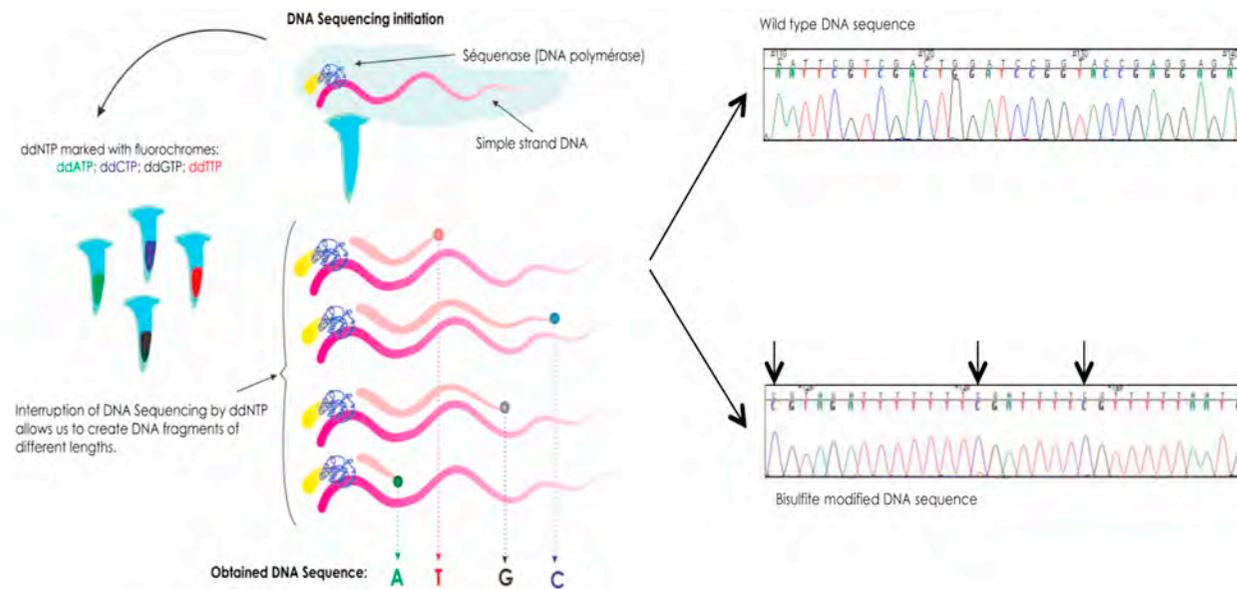


# Développement de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?
  1. Identifier les altérations d'intérêt
  2. Déterminer in vitro/in vivo les traitements actifs en présence de cette altération
  3. Mettre en place les tests permettant de rechercher cette altération
  4. Favoriser l'accès au traitement et confirmer son efficacité

# Détecter les altérations pertinentes en routine

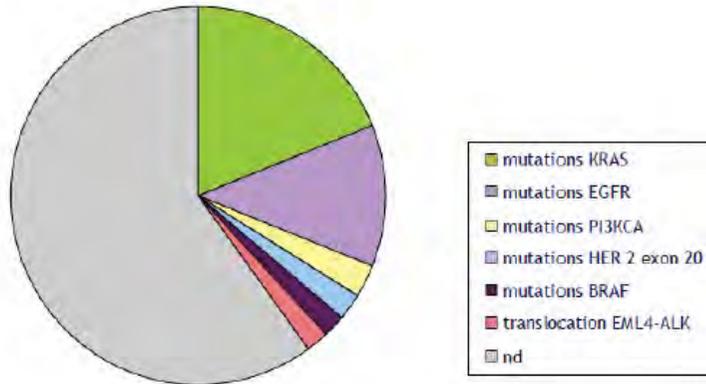
- Séquençage gène par gène, méthode de Sanger
- Utilisé tant que le nombre de cibles était limité



# Détecter les altérations pertinentes en routine

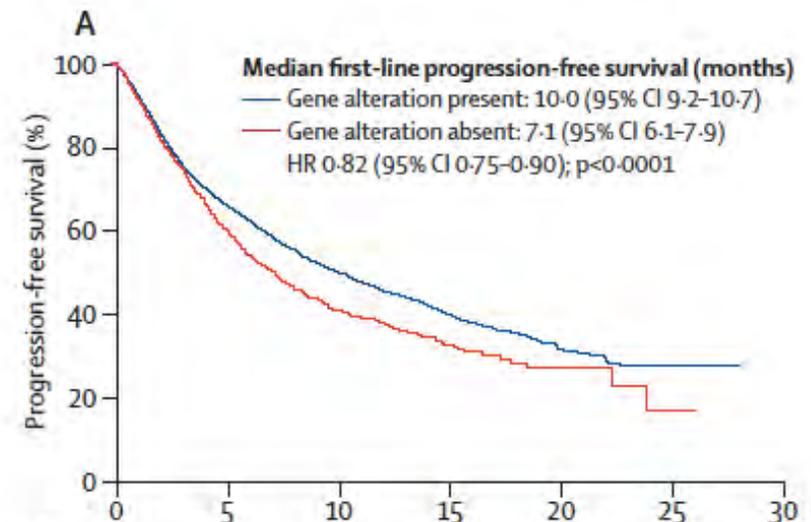
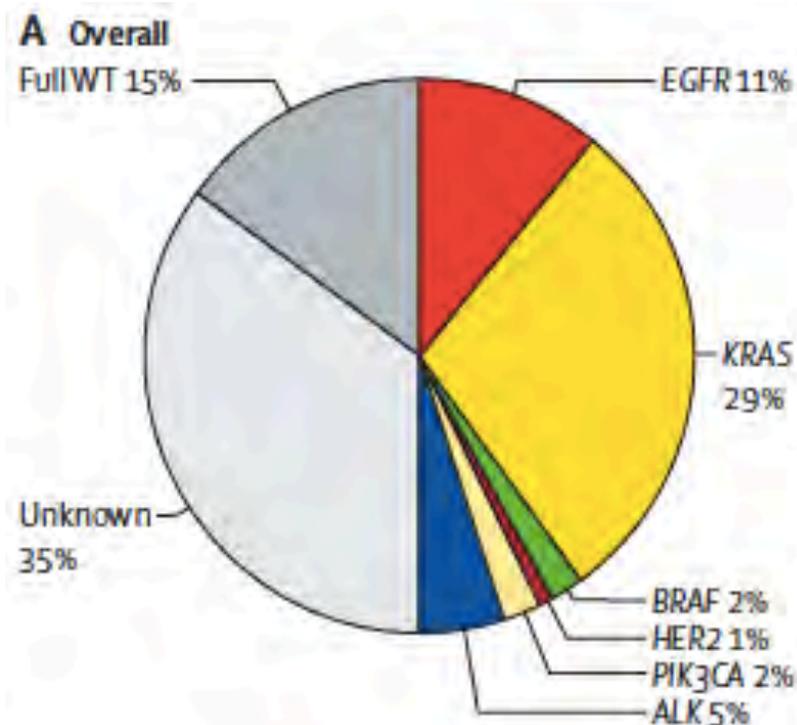
- Séquençage gène par gène, méthode de Sanger
- Utilisé tant que le nombre de cibles était limité

## Liste biomarqueurs émergents INCa - 2011



# Détecter les altérations pertinentes en routine

- Biomarqueurs France



| Number at risk          | 0    | 5    | 10   | 15  | 20  | 25 | 30 |
|-------------------------|------|------|------|-----|-----|----|----|
| Gene alteration present | 3498 | 1873 | 1134 | 453 | 119 | 8  | 0  |
| Gene alteration absent  | 1126 | 504  | 251  | 90  | 17  | 2  | 0  |

# Détecter les altérations pertinentes en routine

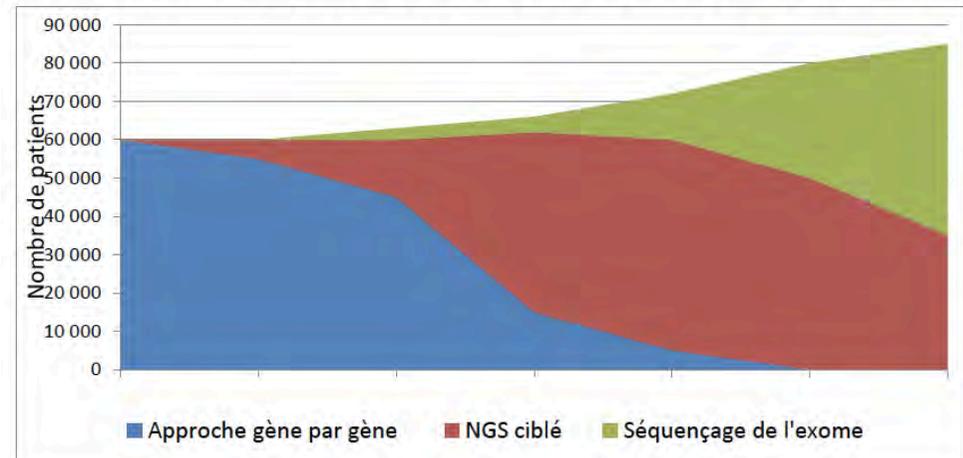
- Evolution vers le séquençage de nouvelle génération (NGS)
1. Restriction aux altérations les plus fréquentes – Nécessité d'identifier de nouvelles cibles, mécanismes de résistance
  2. Saturation des capacités des plateformes

## Indications hors cancer du poumon

| Pathologie                   | Biomarqueur(s)   | Molécules prescrites   |
|------------------------------|--|--|
| Cancer du sein               | Amplification d'HER2   | Trastuzumab, Pertuzumab, Lapatinib   |
| Cancer de l'estomac          | Amplification d'HER2   | Trastuzumab  |
| Cancer colorectal            | Mutations de KRAS<br>Mutations de NRAS                           | Panitumumab, Cetuximab   |
| GIST                         | Mutations de KIT<br>Mutations de PDGFRA                          | Imatinib   |
| Cancer du poumon             | Mutations d'EGFR<br>Translocation d'ALK<br>Translocation de ROS1 | Gefitinib, Erlotinib, Afatinib, Osimertinib<br>Crizotinib, Ceritinib<br>Crizotinib |
| Mélanome                     | Mutation de BRAF V600  | Vemurafenib, Dabrafenib, Cobimetinib,<br>Trametinib                                |
| Leucémies                    | Détection de BCR-ABL<br>Mutations d'ABL                          | Imatinib, Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib,<br>Ponatinib                            |
| Leucémie lymphoïde chronique | Délétion 17p<br>Mutation de TP53                                 | Idelalisib   |
| Syndrome myéloprolifératif   | Réarrangement de PDGFR   | Imatinib   |
| Syndrome myélodysplasique    | Réarrangement de PDGFR   | Imatinib   |
| Leucémie chronique à éosino. | Réarrangement FIP1L1-PDGFR                                       | Imatinib   |

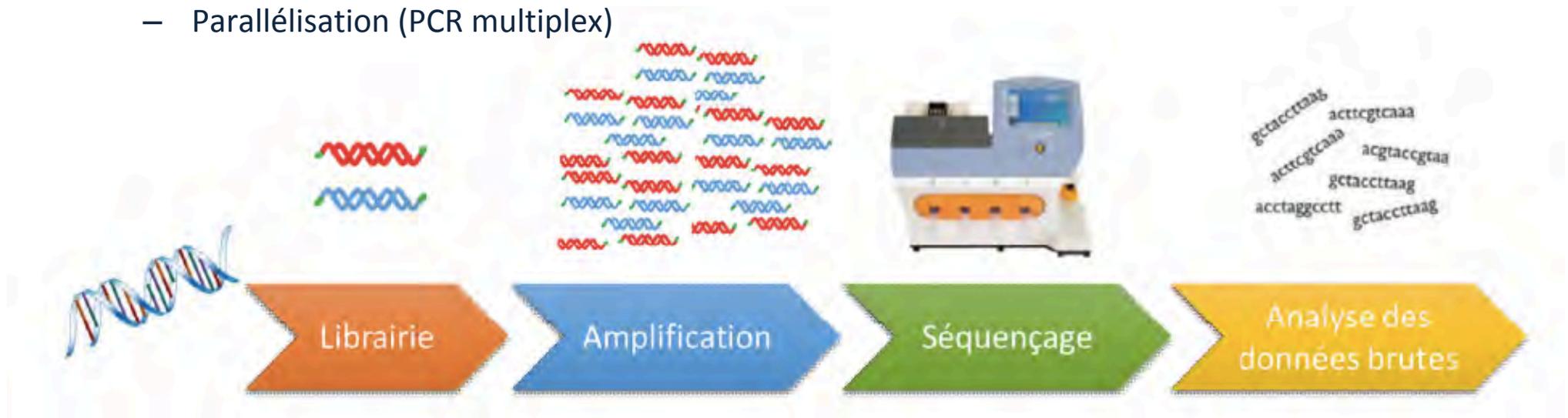
## Développement anticipé du NGS et de l'exome

Fig. 40. Evolution envisagée pour le séquençage extensif du génome tumoral d'ici la fin du Plan cancer



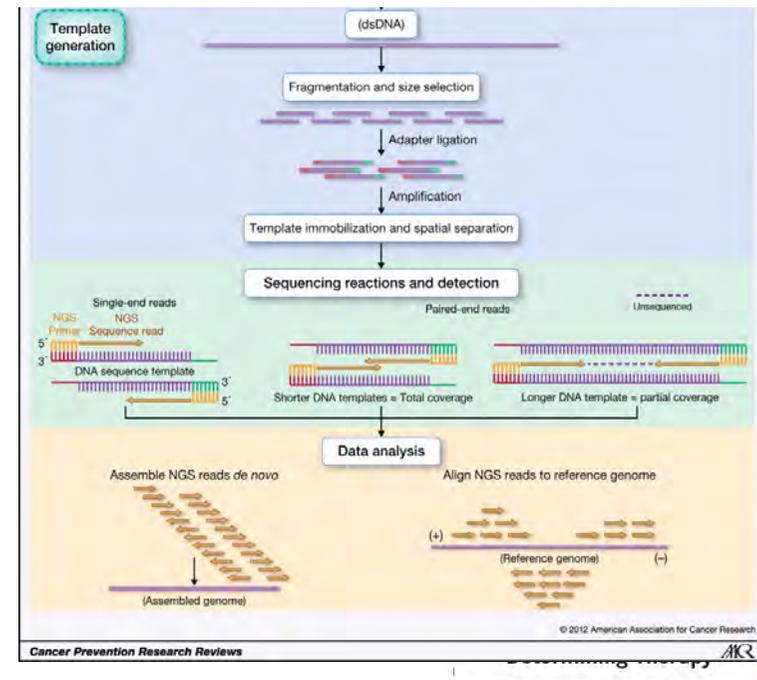
# Détecter les altérations pertinentes en routine

- Evolution vers le séquençage de nouvelle génération (NGS)
  - Intégration (système combinant les avantages de la PCR et des puces)
  - Miniaturisation
  - Parallélisation (PCR multiplex)



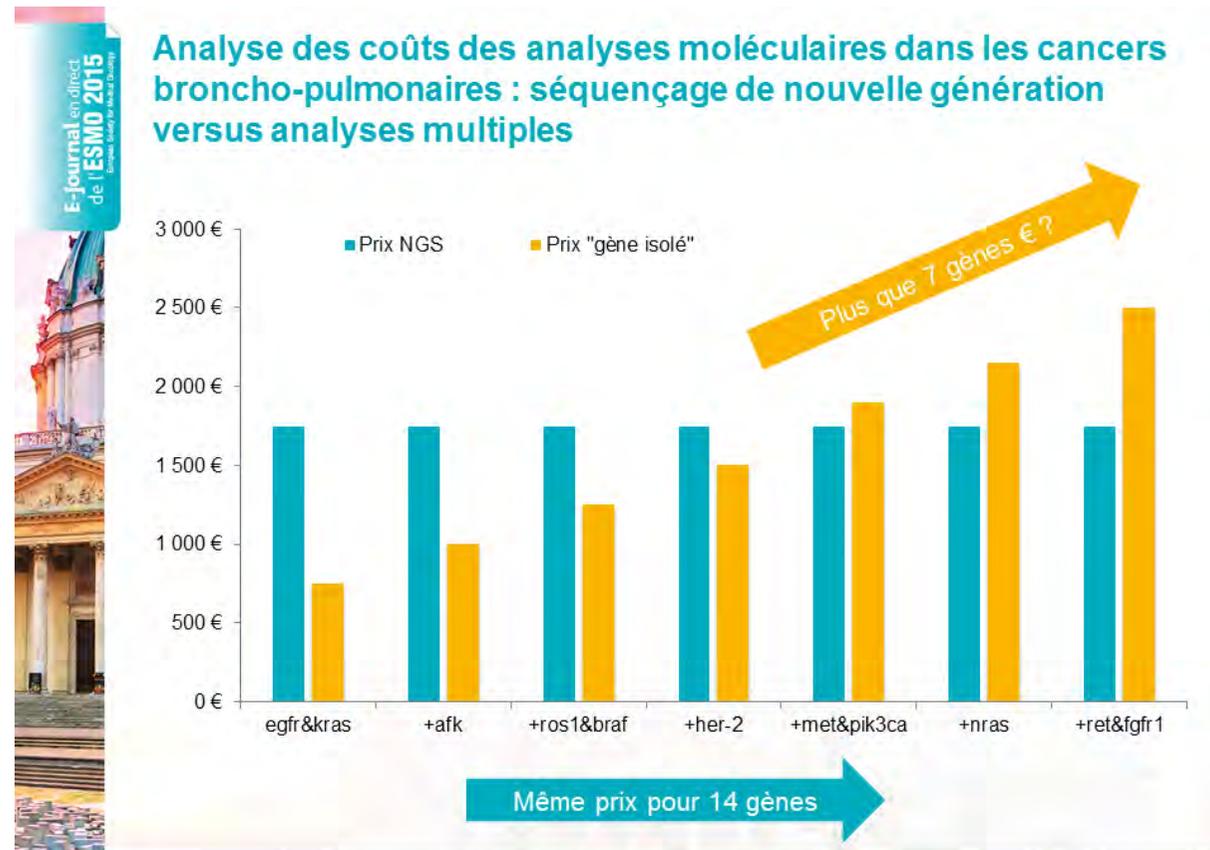
# Détecter les altérations pertinentes en routine

- Evolution vers le séquençage de nouvelle génération (NGS)
  - Possibilité de détecter de multiples mutations
  - Possibilité de quantifier les mutations
  - Possibilité de détecter des mutations présentes en faible pourcentage
  - Economie de matériel biologique



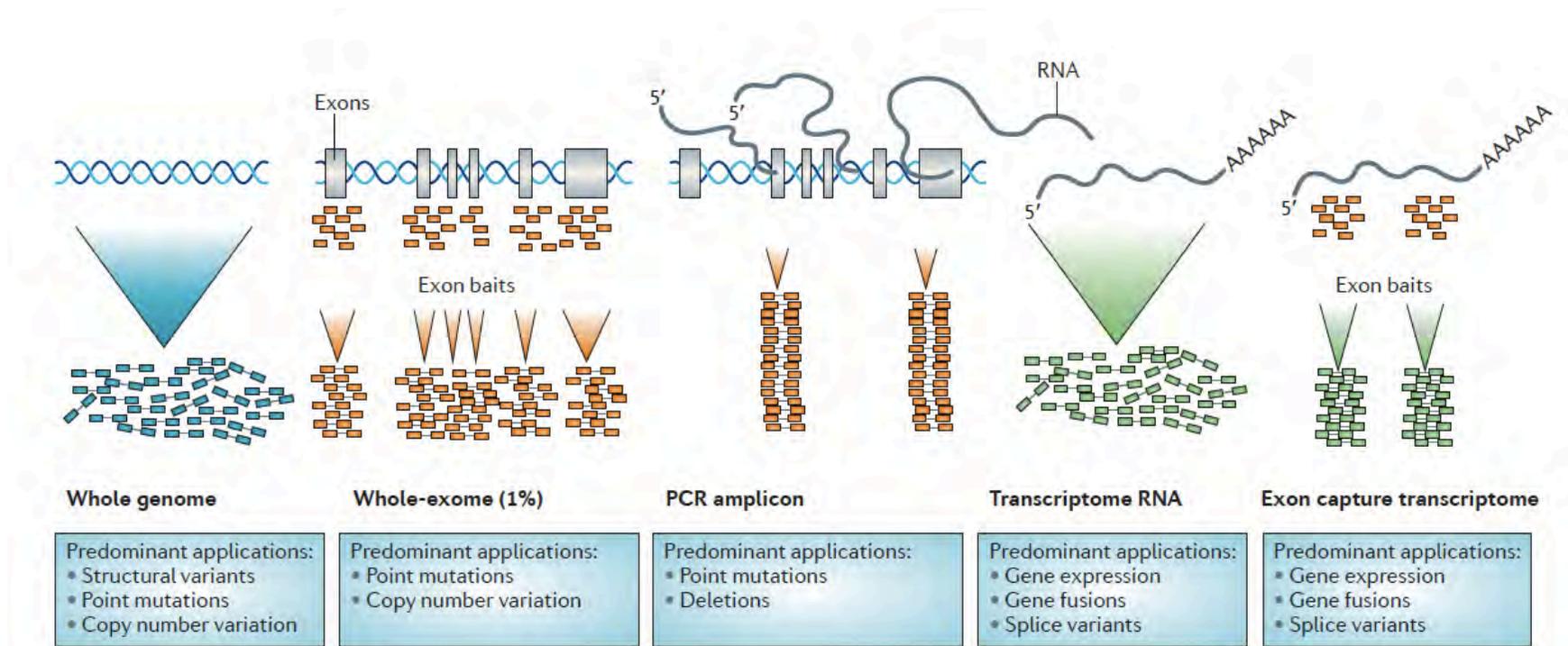
# Séquençage de nouvelle génération NGS

## Coût NGS



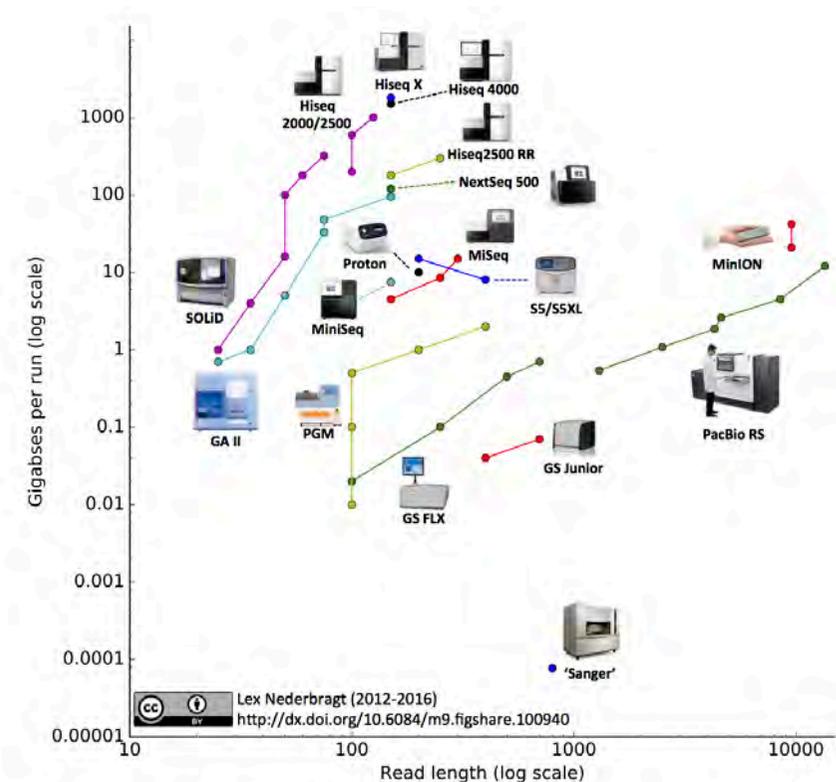
# Détecter les altérations pertinentes en routine

- Applications du Séquençage de nouvelle génération (NGS)



# Détecter les altérations pertinentes en routine

- Séquençage de nouvelle génération (NGS)
  - NGS de tout l'exome – limites :
    - Coût
    - Taille des données générées
    - Analyse complexe des données
  - NGS ciblé – avantages :
    - Focalisation sur les régions d'intérêt
    - Diminution du coût
    - Analyse simplifiée
- Evolution technologique rendant plus accessible l'analyse de l'exome à moyen terme



# Détecter les altérations pertinentes en routine

- Panels commerciaux NGS ciblé

Table 1. Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel v2.

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Sample type                   | FFPE samples   |
| Application                   | Somatic mutation detection   |
| Genes                         | <i>KRAS</i> , <i>EGFR</i> , <i>BRAF</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>AKT1</i> , <i>ERBB2</i> , <i>PTEN</i> , <i>NRAS</i> , <i>STK11</i> , <i>MAP2K1</i> , <i>ALK</i> , <i>DDR2</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>MET</i> , <i>TP53</i> , <i>SMAD4</i> , <i>FBX7</i> , <i>FGFR3</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>ERBB4</i> , <i>FGFR1</i> , and <i>FGFR2</i> |
| Primer pairs, amplicon length | 92 pairs of primers in a single pool<br>92 amplicons with an average length of 162 bp  |
| Input DNA required            | 10 ng  |
| Observed performance          | Percent of amplicons with the target base coverage at 500x: >95%<br>Average panel uniformity: 95%<br>Average percent reads on target: 98%  |
| Multiplexing                  | 2 samples per Ion 314™ Chip with at least 500x sequencing coverage<br>8 samples per Ion 316™ Chip with at least 500x sequencing coverage<br>16 samples per Ion 318™ Chip with at least 500x sequencing coverage  |

# Détecter les altérations pertinentes en routine

- Panels larges :
  - Panels commerciaux (type Oncomine)
  - Solutions commerciales « clés en main » (type Foundation One)

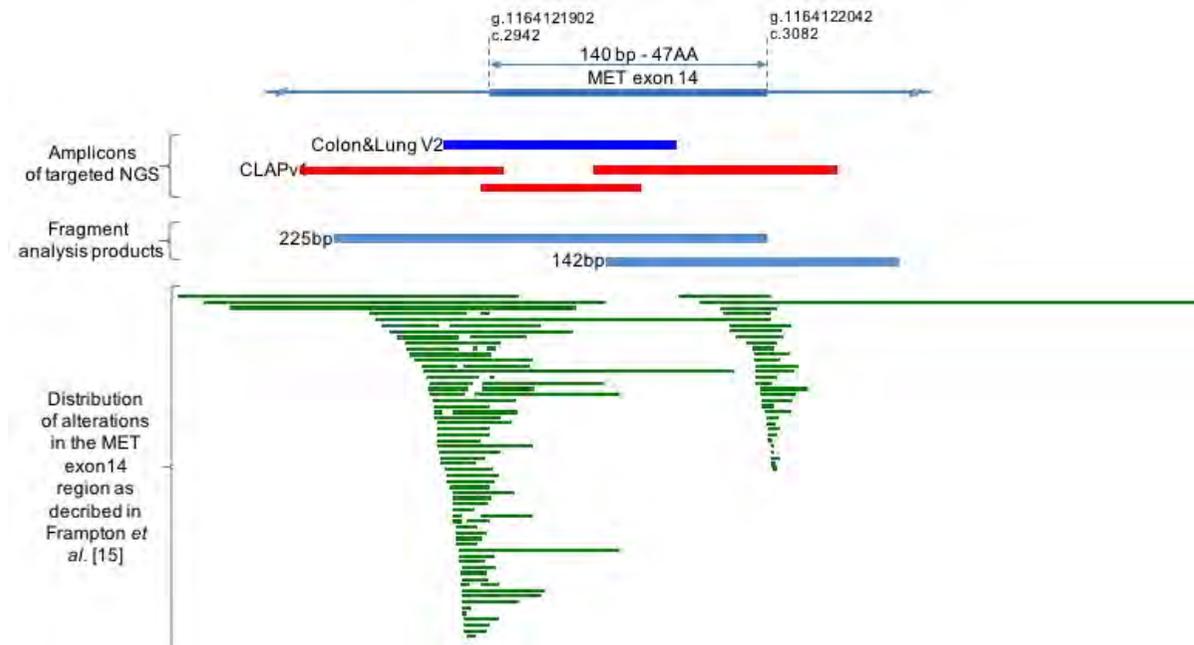
## FOUNDATIONONE® CURRENT GENE LIST\*

FoundationOne® is a pan-cancer comprehensive genomic profile, which interrogates the entire coding sequence of 315 cancer-related genes plus introns from 28 genes often rearranged or altered in cancer.

| CURRENT GENE LIST     |                 |        |        |                 |               |              |          |         |                      |
|-----------------------|-----------------|--------|--------|-----------------|---------------|--------------|----------|---------|----------------------|
| ABL1                  | BRAF            | CHEK1  | FANCC  | GATA3           | JAK2          | MITF         | PDCD1LG2 | RBM10   | STAT4                |
| ABL2                  | BRCA1           | CHEK2  | FANCD2 | GATA4           | JAK3          | MLH1         | PDGFRA   | RET     | STK11                |
| ACVR1B                | BRCA2           | CIC    | FANCE  | GATA6           | JUN           | MPL          | PDGFRB   | RICTOR  | SUFU                 |
| AKT1                  | BRD4            | CREBBP | FANCF  | GID4 (C17orf39) | KAT6A (MYST3) | MRE11A       | PDK1     | RNF43   | SYK                  |
| AKT2                  | BRIP1           | CRKL   | FANCD3 | DLI1            | KDM5A         | MSH2         | PIK3C2B  | RO51    | TAF1                 |
| AKT3                  | BTG1            | CKLF2  | FANCL  | GNAT1           | KDM5C         | MSH6         | PIK3CA   | RPTOR   | TBX3                 |
| ALK                   | BTX             | CSF3R  | FAS    | GNA13           | KDM6A         | MTOR         | PIK3CB   | RUNX1   | TERC                 |
| AMER1 (FAM123B)       | C10orf30 (EMSY) | CTCF   | FAT1   | GNAG            | KDR           | MULTYH       | PIK3CG   | RUNX1T1 | TERT (promoter only) |
| APC                   | CARD11          | CTNNA1 | FBXW7  | GNAS            | KIFAP1        | MYC          | PIK3R1   | SDHA    | TET2                 |
| AR                    | CBFB            | CTNNA1 | FGF10  | GPR124          | KEL           | MYCL (MYCL1) | PIK3R2   | SDHB    | TGFBR2               |
| ARAF                  | CBL             | CUL3   | FGF14  | GRIN2A          | KIT           | MYCN         | PLCG2    | SOHC    | TNFAIP3              |
| ARFRP1                | CCND1           | CYLD   | FGF19  | ORM3            | KLHL6         | MYD88        | PM52     | SOHD    | TNFRSF14             |
| ARID1A                | CCND2           | DAXX   | FGF23  | GSK3B           | KMT2A (MLL)   | NF1          | POLD1    | SETD2   | TDP1                 |
| ARID1B                | CCND3           | DDR2   | FGF3   | H3F3A           | KMT2C (MLL3)  | NF2          | POLE     | SF3B1   | TDP2A                |
| ARID2                 | CCNE1           | DICER1 | FGF4   | HGF             | KMT2D (MLL2)  | NFE2L2       | PPP2R1A  | SLIT2   | TP53                 |
| ASK1                  | CD274           | DNMT3A | FGF6   | HNF1A           | KRAS          | NFKB1A       | PRDM1    | SMAD2   | TSC1                 |
| ATM                   | CD79A           | DOT1L  | FGFR1  | HRAS            | LMO1          | NKX2-1       | PREX2    | SMAD3   | TSC2                 |
| ATR                   | CD79B           | EGFR   | FGFR2  | HSD3BB1         | LRP1B         | NOTCH1       | PRKARIA  | SMAD4   | TSHR                 |
| ATRX                  | CDC73           | EP300  | FGFR3  | HSP90AA1        | LYN           | NOTCH2       | PRKC1    | SMARCA4 | U2AF1                |
| AURKA                 | CDH1            | EPHA3  | FGFR4  | IDH1            | LZTR1         | NOTCH3       | PRKDC    | SMARCB1 | VEGFA                |
| AURKB                 | CDK2            | EPHA5  | FH     | IDH2            | MAGI2         | NPM1         | PRSS8    | SPO     | VHL                  |
| AXIN1                 | CDK4            | EPHA7  | FLCN   | IGFBP           | MAP2K1        | NRAS         | PTCH1    | SNCAIP  | WISP3                |
| AXL                   | CDK6            | EPHB1  | FLT3   | IGF2            | MAP2K2        | NSD1         | PTEN     | SOC3    | WT1                  |
| BAP1                  | CDK8            | ERBB2  | FLT3   | IKBKE           | MAP2K4        | NTRK1        | P7E11    | SOX10   | XPO1                 |
| BAR1                  | CDKN1A          | ERBB3  | FLT4   | IKZF1           | MAP3K1        | NTRK2        | GKI      | SOX2    | ZBTB2                |
| BCL2                  | CDKN1B          | ERBB4  | FOXO2  | IL7R            | MCL1          | NTRK3        | RAC1     | SOX9    | ZNF217               |
| BCL2L1                | CDKN2A          | ERG    | FOXO1  | INHBA           | MDM2          | NUP93        | RAD50    | SPEN    | ZNF703               |
| BCL2L2                | CDKN2B          | ERF1   | FRS2   | INPP4B          | MDM4          | PAK3         | RAD51    | SKOP    |                      |
| BCL6                  | CDKN2C          | ESR1   | FUBP1  | IRF2            | MED12         | PALB2        | RAF1     | SPTA1   |                      |
| BCOR                  | CEBPA           | EZH2   | GABRA6 | IRF4            | MEF2B         | PARK2        | RANBP2   | SRC     |                      |
| BCORL1                | CHD2            | FAM46C | GATA1  | IRS2            | MEN1          | PAX5         | RARA     | STAG2   |                      |
| BLM                   | CHD4            | FANCA  | GATA2  | JAK1            | MET           | PBRM1        | RB1      | STAT3   |                      |
| SELECT REARRANGEMENTS |                 |        |        |                 |               |              |          |         |                      |
| ALK                   | BRAF            | BRD4   | ETV4   | FGFR1           | KIT           | MYC          | NTRK2    | RARA    | TPR52                |
| BCL2                  | BRCA1           | EGFR   | ETV5   | FGFR2           | MSH2          | NOTCH2       | PDGFRA   | RET     |                      |
| BCR                   | BRCA2           | ETV1   | ETV6   | FGFR3           | MYB           | NTRK1        | RAF1     | ROS1    |                      |

# Détecter les altérations pertinentes en routine

- Possibilité de développer des panels « maison » répondant à des besoins spécifiques
- Exemple des mutations MET exon 14
- Développement d'un panel spécifique couvrant les 2 sites d'épissage et l'exon 14

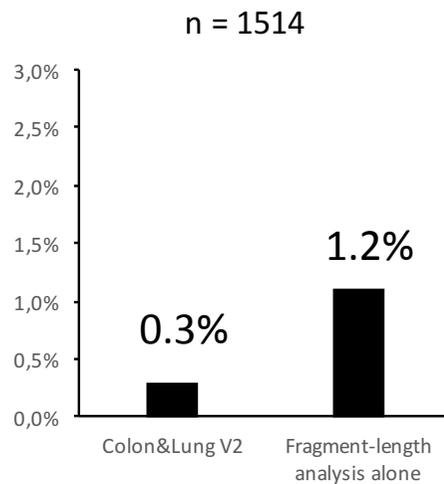


# Détecter les altérations pertinentes en routine

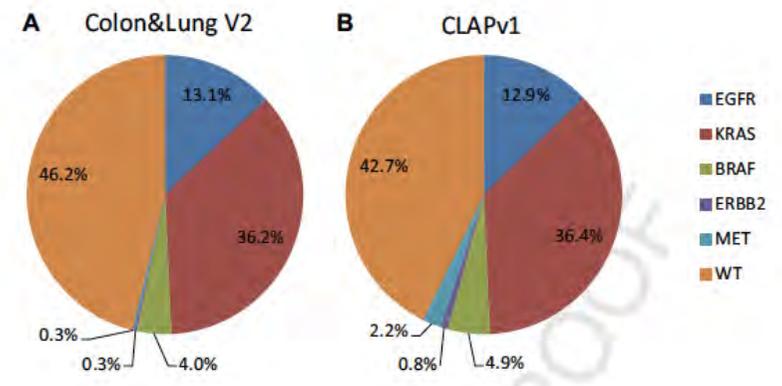
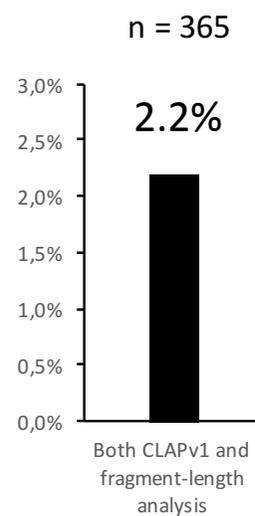
## Résultats

L'utilisation de ce panel, couplé à une analyse de fragments, augmente le taux de détection de 0.3% à 2.2%

**A**

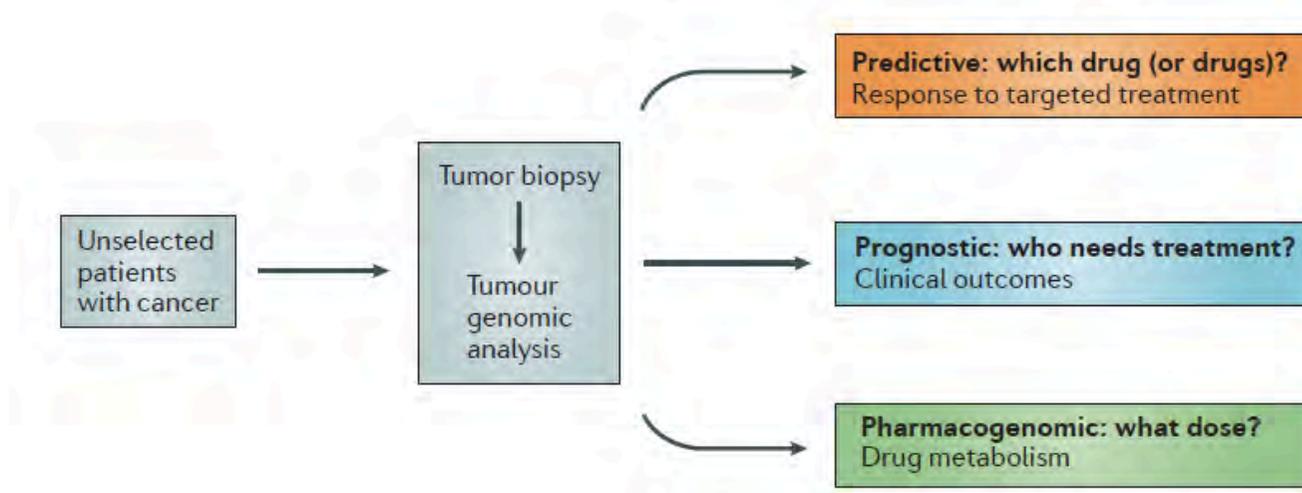


**B**



# Quelles informations apporte le NGS?

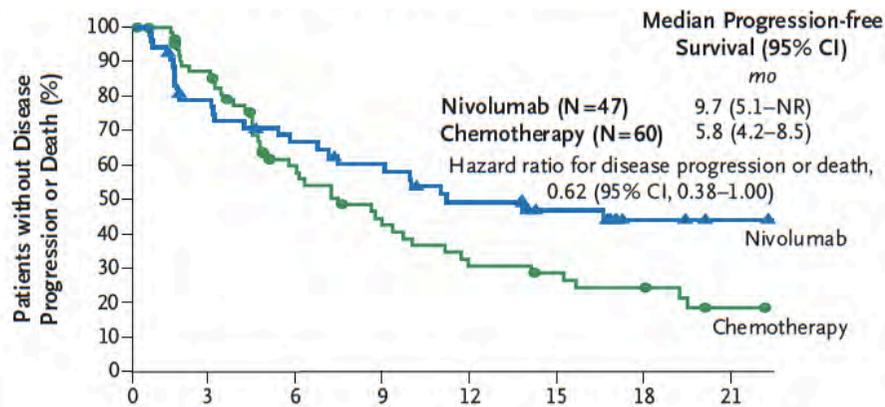
- Au-delà de l'identification de cibles accessibles à un traitement, le NGS apporte d'autres informations:
- Identification de marqueurs associés à une sensibilité ou résistance à certains traitements
- Identification de marqueurs pharmacogénomiques
- Identifications d'anomalies constitutionnelles de susceptibilité à certaines maladies



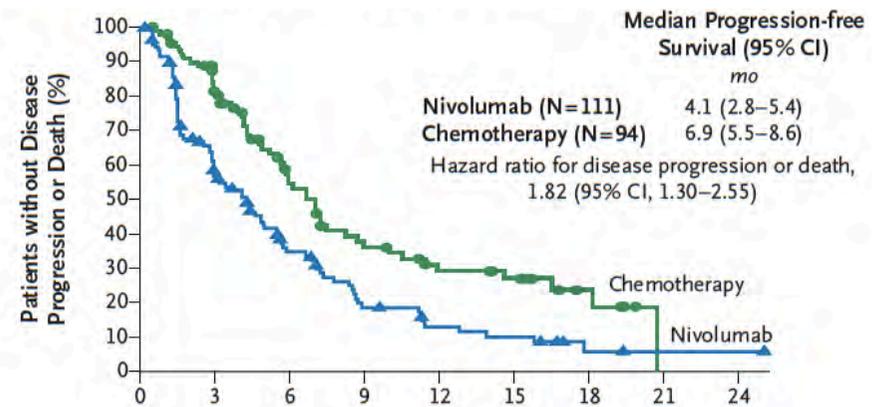
# Quelles informations apporte le NGS?

- Identification de marqueurs en dehors de la cible associés à une sensibilité ou résistance à certains traitements
- Exemple de la charge mutationnelle (TMB) et immunothérapie

Charge mutationnelle élevée

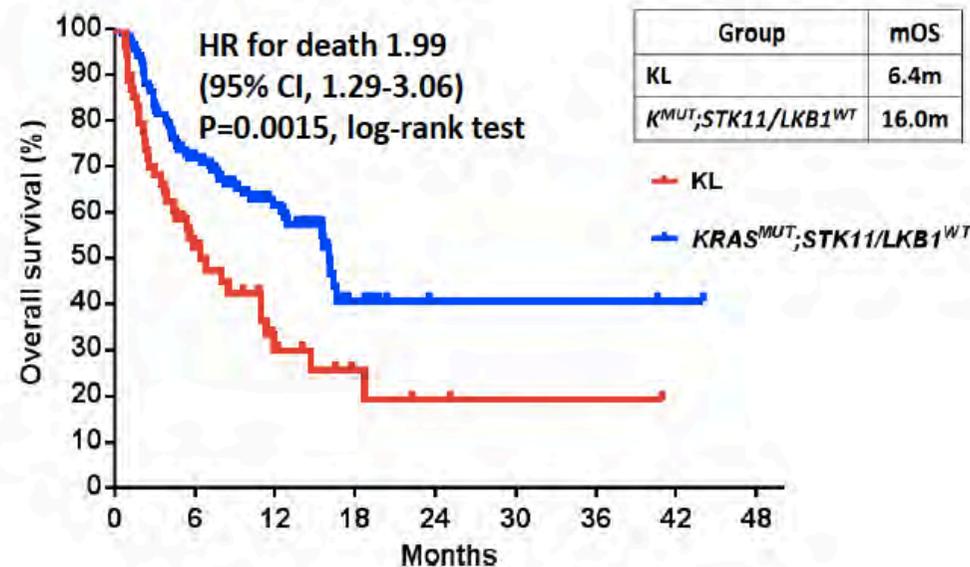


Charge mutationnelle basse ou intermédiaire



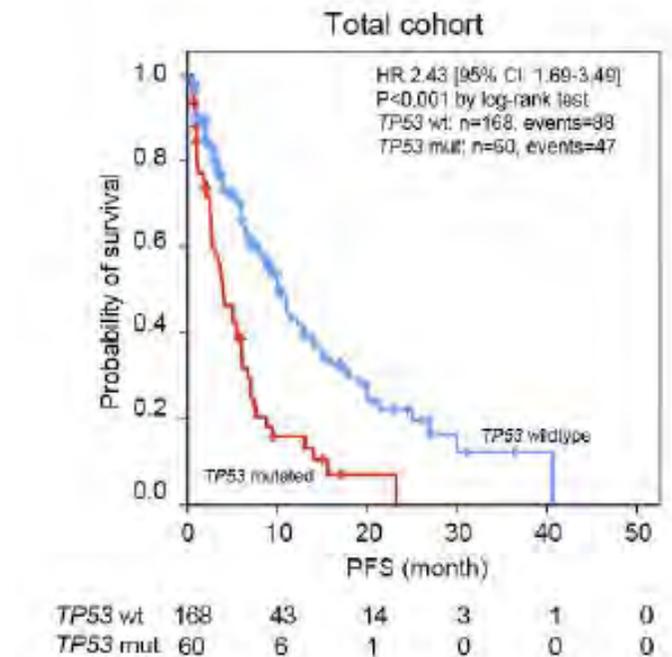
# Quelles informations apporte le NGS?

- Identification de marqueurs en dehors de la cible associés à une sensibilité ou résistance à certains traitements
- Exemple des mutations STK11 et immunothérapie chez les patients KRAS-mutés



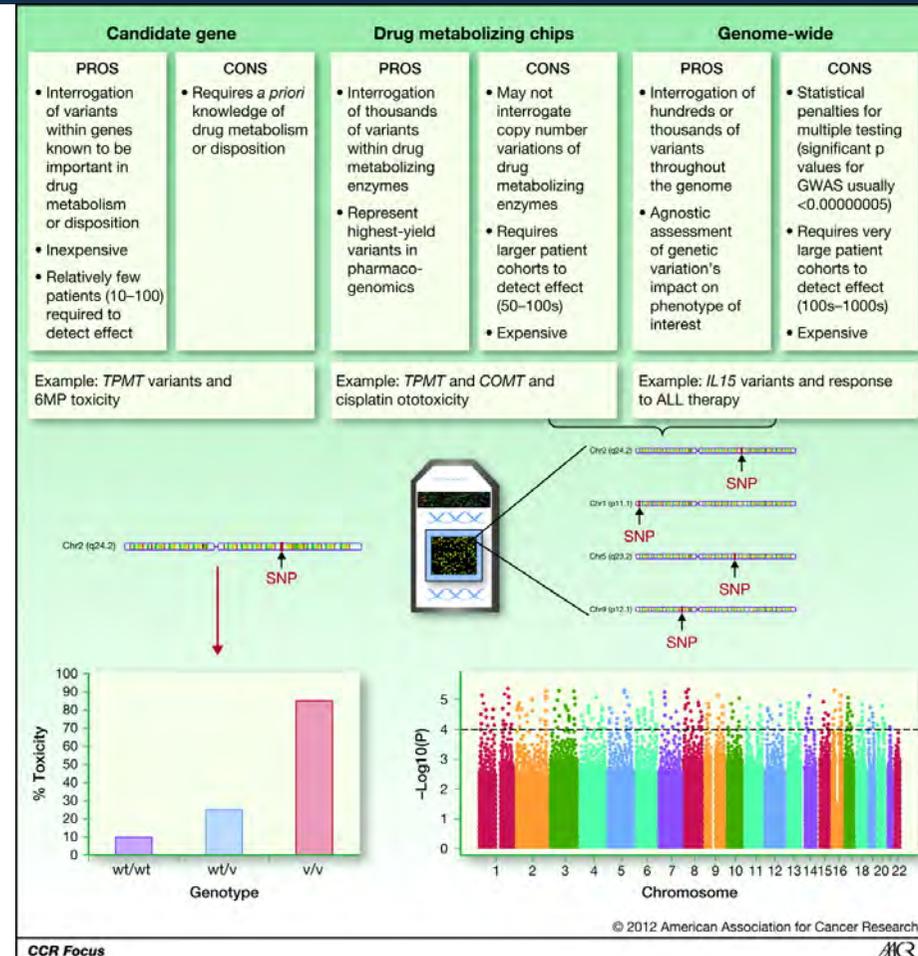
# Quelles informations apporte le NGS?

- Identification de marqueurs en dehors de la cible associés à une sensibilité ou résistance à certains traitements
- Exemple des mutations TP53 chez les patients ALK-réarrangés



# Quelles informations apporte le NGS?

- **Identification de marqueurs pharmacogénomiques**
- Anomalies constitutionnelles
- Exemple de la toxicité à l'irinotecan, ototoxicité du cisplatine



# Quelles informations apporte le NGS?

- **Identifications d'anomalies constitutionnelles de susceptibilité à certaines maladies**

## **ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing**

Robert C. Green, MD, MPH<sup>1,2</sup>, Jonathan S. Berg, MD, PhD<sup>3</sup>, Wayne W. Grody, MD, PhD<sup>4-6</sup>, Sarah S. Kalia, ScM, CGC<sup>1</sup>, Bruce R. Korf, MD, PhD<sup>7</sup>, Christa L. Martin, PhD, FACMG<sup>8</sup>, Amy L. McGuire, JD, PhD<sup>9</sup>, Robert L. Nussbaum, MD<sup>10</sup>, Julianne M. O'Daniel, MS, CGC<sup>3</sup>, Kelly E. Ormond, MS, CGC<sup>11</sup>, Heidi L. Rehm, PhD, FACMG<sup>2,12</sup>, Michael S. Watson, PhD, FACMG<sup>13</sup>, Marc S. Williams, MD, FACMG<sup>14</sup> and Leslie G. Biesecker, MD<sup>15</sup>

# Quelles informations apporte le NGS?

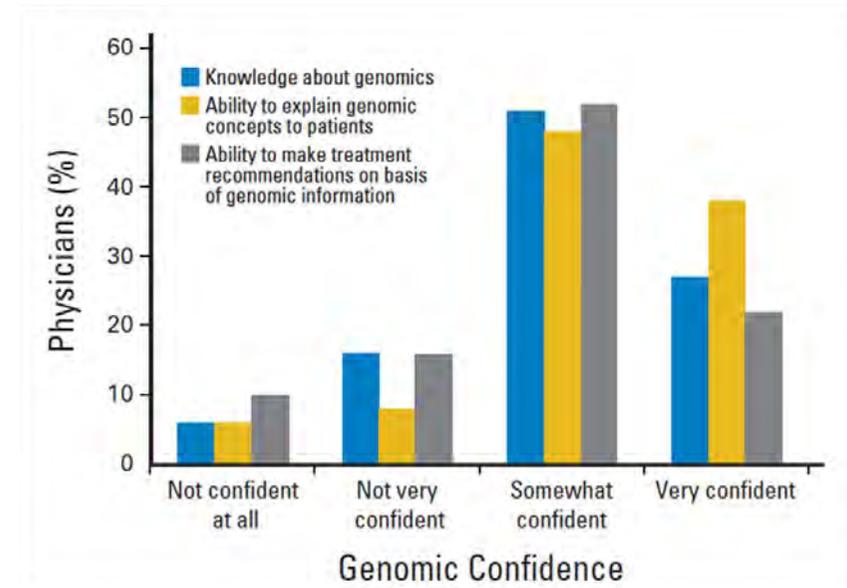
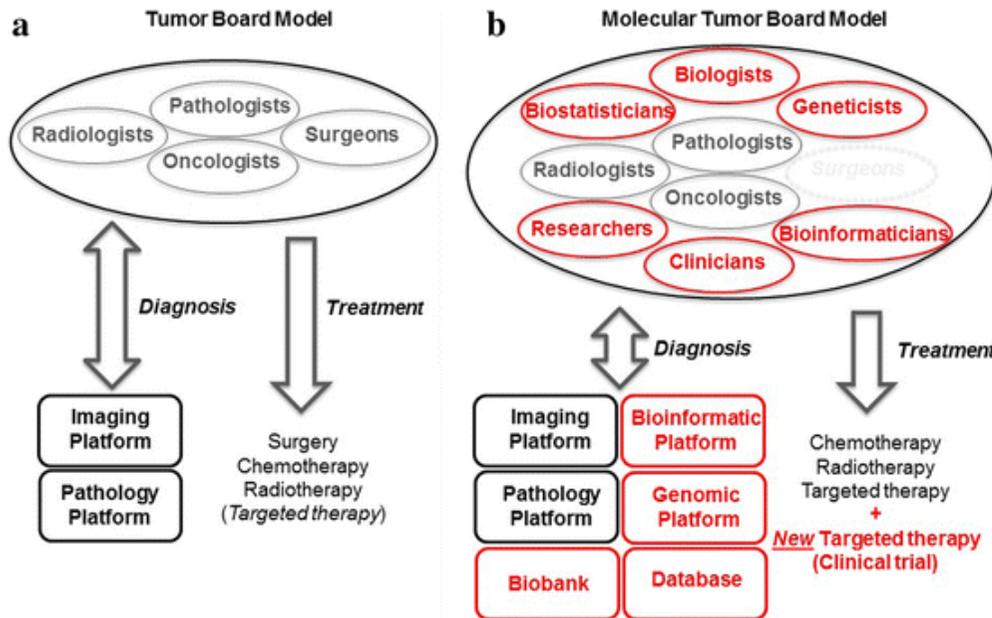
- **Identifications d'anomalies constitutionnelles de susceptibilité à certaines maladies**

| Phenotype  | MIM-disorder                                    | PMID-Gene Reviews entry | Typical age of onset | Gene   | MIM-gene                             | Inheritance <sup>a</sup> | Variants to report <sup>b</sup> |
|--|---|-------------------------|----------------------|--|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Hereditary breast and ovarian cancer   | 604370<br>612555                                | 20301425                | Adult                | <i>BRCA1</i><br><i>BRCA2</i>                             | 113705<br>600185                     | AD                       | KP and EP                       |
| Li-Fraumeni syndrome   | 151623  | 20301488                | Child/adult          | <i>TP53</i>  | 191170                               | AD                       | KP and EP                       |
| Peutz-Jeghers syndrome   | 175200  | 20301443                | Child/adult          | <i>STK11</i>   | 602216                               | AD                       | KP and EP                       |
| Lynch syndrome   | 120435  | 20301390                | Adult                | <i>MLH1</i><br><i>MSH2</i><br><i>MSH6</i><br><i>PMS2</i> | 120436<br>609309<br>600678<br>600259 | AD                       | KP and EP                       |
| Familial adenomatous polyposis   | 175100  | 20301519                | Child/adult          | <i>APC</i>   | 611731                               | AD                       | KP and EP                       |
| <i>MYH</i> -associated polyposis; adenomas, multiple colorectal, <i>FAP</i> type 2; colorectal adenomatous polyposis, autosomal recessive, with pilomatricomas | 608456<br>132600                                | 23035301                | Adult                | <i>MUTYH</i>   | 604933                               | AR <sup>c</sup>          | KP and EP                       |
| Von Hippel-Lindau syndrome   | 193300  | 20301636                | Child/adult          | <i>VHL</i>   | 608537                               | AD                       | KP and EP                       |
| Multiple endocrine neoplasia type 1  | 131100  | 20301710                | Child/adult          | <i>MEN1</i>  | 613733                               | AD                       | KP and EP                       |
| Multiple endocrine neoplasia type 2  | 171400<br>162300                                | 20301434                | Child/adult          | <i>RET</i>   | 164761                               | AD                       | KP                              |
| Familial medullary thyroid cancer <sup>d</sup>   | 1552401   | 20301434                | Child/adult          | <i>RET</i>   | 164761                               | AD                       | KP                              |
| <i>PTEN</i> hamartoma tumor syndrome   | 153480  | 20301661                | Child/adult          | <i>PTEN</i>  | 601728                               | AD                       | KP and EP                       |
| Retinoblastoma   | 180200  | 20301625                | Child                | <i>RB1</i>   | 614041                               | AD                       | KP and EP                       |
| Hereditary paraganglioma-pheochromocytoma syndrome   | 168000 (PGL1)<br>601650 (PGL2)<br>605373 (PGL3) | 20301715                | Child/adult          | <i>SDHD</i><br><i>SDHAF2</i><br><i>SDHC</i>              | 602690<br>613019<br>602413           | AD                       | KP and EP<br>KP<br>KP and EP    |

| Phenotype  | MIM-disorder   | PMID-Gene Reviews entry | Typical age of onset | Gene  | MIM-gene   | Inheritance <sup>a</sup>                           | Variants to report <sup>b</sup>   |
|--|--|-------------------------|----------------------|---|--|--|---|
| Hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy              | 115197<br>192600<br>601494<br>613690<br>115196<br>608751<br>612098<br>600858<br>301500<br>608758<br>115200 | 20301725                | Child/adult          | <i>MYBPC3</i><br><i>MYH7</i><br><i>TNNT2</i><br><i>TNNI3</i><br><i>TPM1</i><br><i>MYL3</i><br><i>ACTC1</i><br><i>PRKAG2</i><br><i>GLA</i><br><i>MYL2</i><br><i>LMNA</i> | 600958<br>160760<br>191045<br>191044<br>191010<br>160790<br>102540<br>602743<br>300644<br>160781<br>150330 | AD<br>AD<br>AD<br>AD<br>AD<br>AD<br>AD<br>XL<br>AD | KP and EP<br>KP<br>KP and EP<br>KP<br>KP<br>KP<br>KP and EP (hemi, het, hom)<br>KP<br>KP and EP |
| Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia            | 604772   |                         |                      | <i>RYR2</i>   | 180902   | AD   | KP  |
| Arrhythmogenic right-ventricular cardiomyopathy                  | 609040<br>604400<br>610476<br>607450<br>610193   | 20301310                | Child/adult          | <i>PKP2</i><br><i>DSP</i><br><i>DSC2</i><br><i>TMEM43</i><br><i>DSG2</i>  | 602861<br>125647<br>125645<br>612048<br>125671   | AD   | KP and EP<br>KP and EP<br>KP and EP<br>KP<br>KP and EP  |
| Romano-Ward long QT syndrome types 1, 2, and 3, Brugada syndrome | 192500<br>613688<br>603830<br>601144   | 20301308                | Child/adult          | <i>KCNQ1</i><br><i>KCNH2</i><br><i>SCN5A</i>  | 607542<br>152427<br>600163   | AD   | KP and EP   |

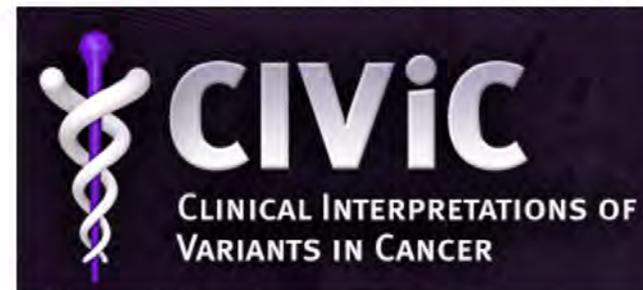
# Comment fait-on pour interpréter un NGS?

- Intérêt de la RCP moléculaire



# Comment fait-on pour interpréter un NGS?

- Développement de bases de connaissances



# Comment fait-on pour interpréter un NGS?

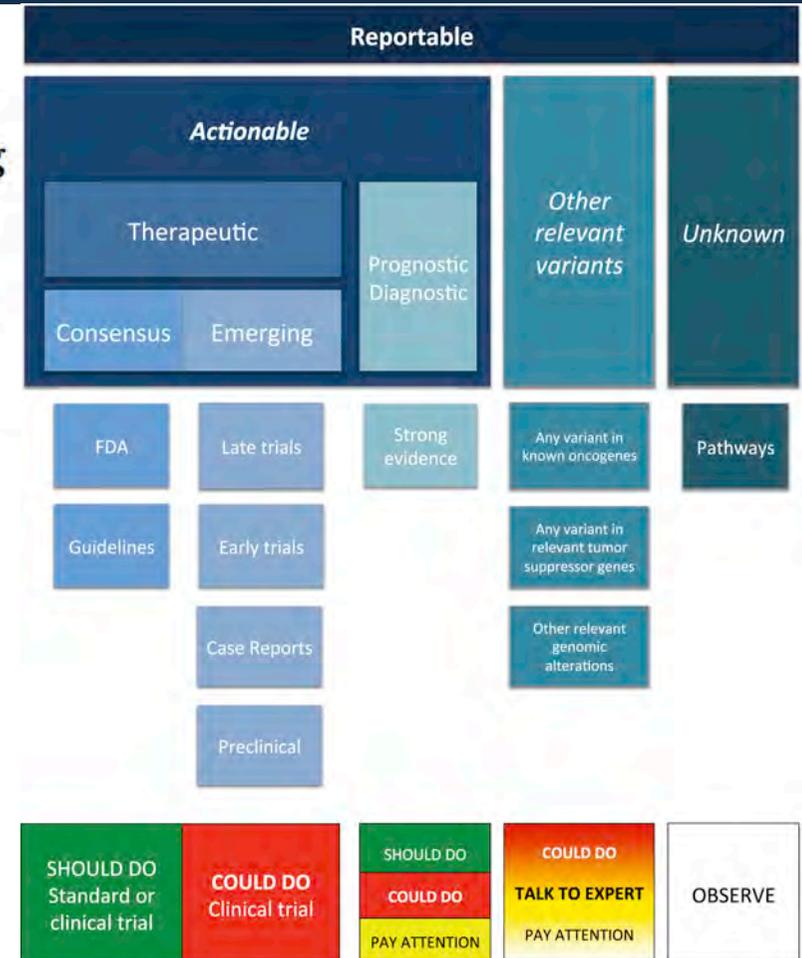
## Review

### Standardized decision support in next generation sequencing reports of somatic cancer variants

Rodrigo Dienstmann<sup>a,\*</sup>, Fei Dong<sup>a</sup>, Darrell Borger<sup>b</sup>, Dora Dias-Santagata<sup>a</sup>, Leif W. Ellisen<sup>b</sup>, Long P. Le<sup>a</sup>, A. John Iafrate<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Molecular Pathology Lab, USA

<sup>b</sup>Massachusetts General Hospital Cancer Center and Harvard Medical School, 55 Fruit St GRJ, Boston, MA 02114, USA



# Comment fait-on pour interpréter

## Review

### Standardized decision support in next generation sequencing reports of somatic cancer variants

Rodrigo Dienstmann<sup>a,\*</sup>, Fei Dong<sup>a</sup>, Darrell Berger<sup>b</sup>, Dora Dias-Santagata<sup>a</sup>, Leif W. Ellisen<sup>b</sup>, Long P. Le<sup>a</sup>, A. John Iafrate<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Molecular Pathology Lab, USA

<sup>b</sup>Massachusetts General Hospital Cancer Center and Harvard Medical School, 55 Fruit St GRJ, Boston, MA 02114, USA

Dienstmann et al. Mol Oncol 2014

Table 1 – Challenges for interpreting genomic data in cancer.

Is this an activating or inactivating mutation?

1. Some mutations are activating and confer oncogene-addiction in specific contexts (FGFR2<sup>S252W</sup> or FGFR2<sup>N549C</sup> in endometrial cancer, effectively targeted by FGFR inhibitors ponatinib and BG398 in preclinical models). Others generate markedly reduced kinase activity and loss-of-function (FGFR2<sup>R251Q</sup> and FGFR2<sup>Y467T</sup> in melanoma, with no predicted benefit with FGFR targeting).

Does this mutation engender sensitivity to specific targeted therapeutics?

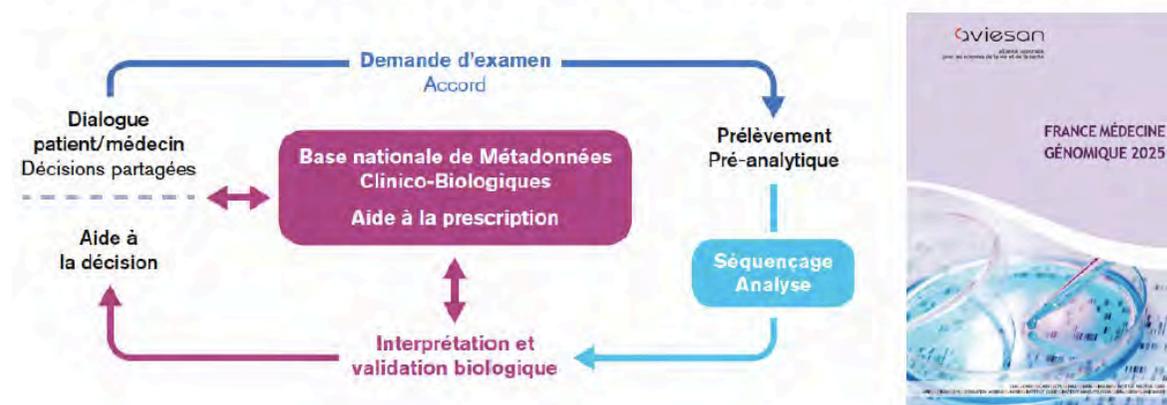
1. Some activating mutations based on *in vitro* models do not confer sensitivity to agents targeting the mutant protein (AKT<sup>E17K</sup> in breast cancer, effectively targeted by non-allosteric AKT inhibitors but not by allosteric AKT inhibitors; MEK<sup>C121S</sup> in melanoma, not inhibited by allosteric MEK inhibitors).
2. With inhibitors of the mutant kinase, level of sensitivity depends on the potency of the agent (EGFR<sup>T790M</sup> in lung cancer, resistant to first-generation EGFR inhibitors but higher sensitivity to novel irreversible inhibitors; ABL1<sup>T315I</sup> in chronic myeloid leukemia, resistant to imatinib and sensitive to ponatinib; ERBB2<sup>L757S</sup> in breast cancer, resistant to lapatinib and sensitive to neratinib).
3. With downstream pathway inhibitors, level of sensitivity strongly depends on the functional effects of the mutation (activating BRAF<sup>V600E</sup> and NRAS<sup>G61</sup> mutations confer sensitivity to MEK inhibitors in melanoma; BRAF<sup>V473C</sup> reduces kinase activity and confers sensitivity to dasatinib in lung cancer, but not to MEK inhibitors).
4. For rare variants in oncogenes, there is no definitive preclinical or clinical data to suggest sensitivity or resistance to targeted therapy (activating PDGFR mutations in the tyrosine kinase domain render tumors susceptible to PDGFR inhibitors in gastrointestinal stromal tumors, but the sensitivity of novel variants in the trans-membrane domain of the gene is currently unknown).
5. Mutations that predict responsiveness to a therapy in some contexts, such as BRAF inhibitors in BRAF<sup>V600E</sup> mutant melanoma, may be associated with entirely different clinical interpretations in others. In colorectal cancer, for example, BRAF<sup>V600E</sup> mutations would direct towards combination of targeted therapies (BRAF plus EGFR inhibitors). It is important to emphasize that sensitivity is tumor context-specific and is influenced by concomitant genomic alterations.

How to select therapy in case of multiple genomic alterations?

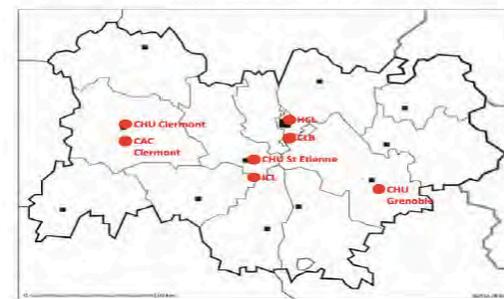
1. The finding of concomitant genomic alterations in a tumor sample collected before systemic therapy can have important biological and therapeutic implications (in the setting of BRAF<sup>V600E</sup> mutant melanoma, NF1 loss predicts resistance to single-agent BRAF inhibitors; identification of BRAF<sup>V600E</sup> and MEK<sup>T124S</sup> in melanoma does not predict resistance to BRAF inhibitors; in KRAS mutant lung cancer, loss-of-function STK11 mutations engender resistance to the combination of MEK inhibitors and docetaxel).
2. In relapsed samples after targeted therapies, identification of “acquired” genomic alterations may be linked to resistance mechanisms and help define subsequent therapies (in EGFR mutant lung cancer progressing to erlotinib, the finding of MET amplification directs to combination therapy with EGFR and MET blockade).
3. On the other hand, prioritizing therapy in the setting of multiple “targetable” alterations is not as straightforward as in previous examples, especially when both targeted drugs are still in early phases of clinical development (activating KRAS<sup>G12D</sup> mutation in pancreatic cancer, targeted by downstream PI3K pathway + MEK inhibitors, often coexist with CDKN2A loss-of-function mutations, which may theoretically predict sensitivity to CDK inhibitors; in prostate cancer, PTEN deletion directs to PI3K pathway inhibitors and the coexistence of BRCA2 loss supports the use of PARP inhibitors).

# Comment fait-on pour interpréter un NGS?

- Challenge : Améliorer la recherche des altérations à large échelle, pour la routine : renforcement des plateformes génomiques



SEQOIA

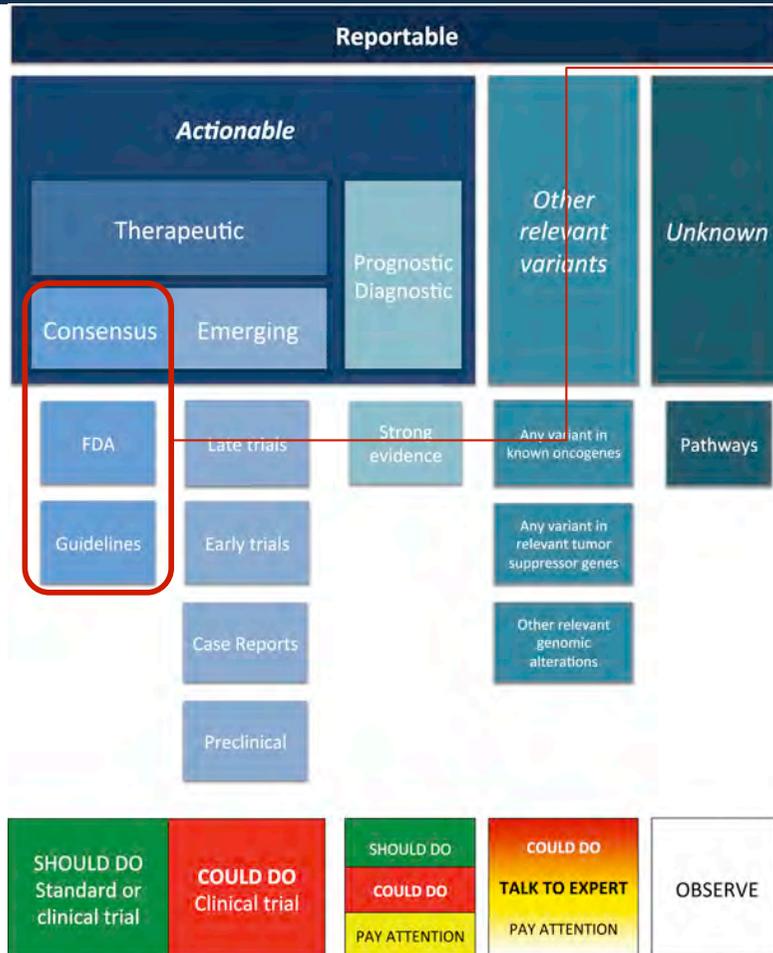


AURAGEN

# Les succès de la médecine de précision

- Peut-on étendre le principe à d'autres mutations?
  1. Identifier les altérations d'intérêt
  2. Déterminer in vitro/in vivo les traitements actifs en présence de cette altération
  3. Mettre en place les tests permettant de rechercher cette altération
  4. Favoriser l'accès au traitement et confirmer son efficacité

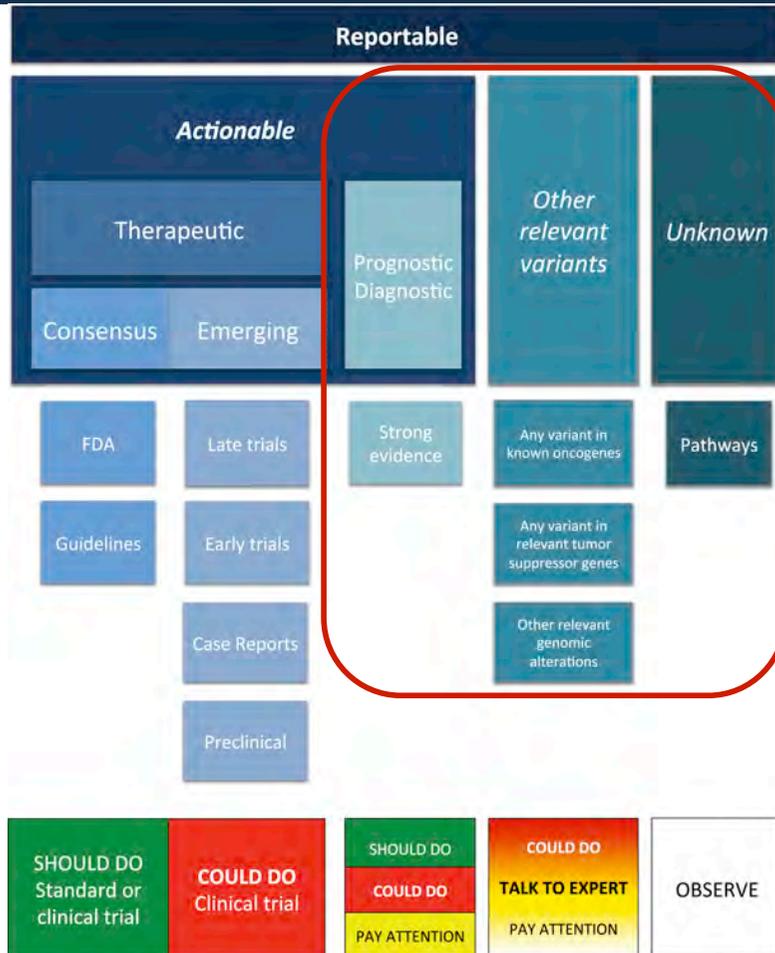
# Favoriser l'accès au traitement



## Prescription dans l'AMM

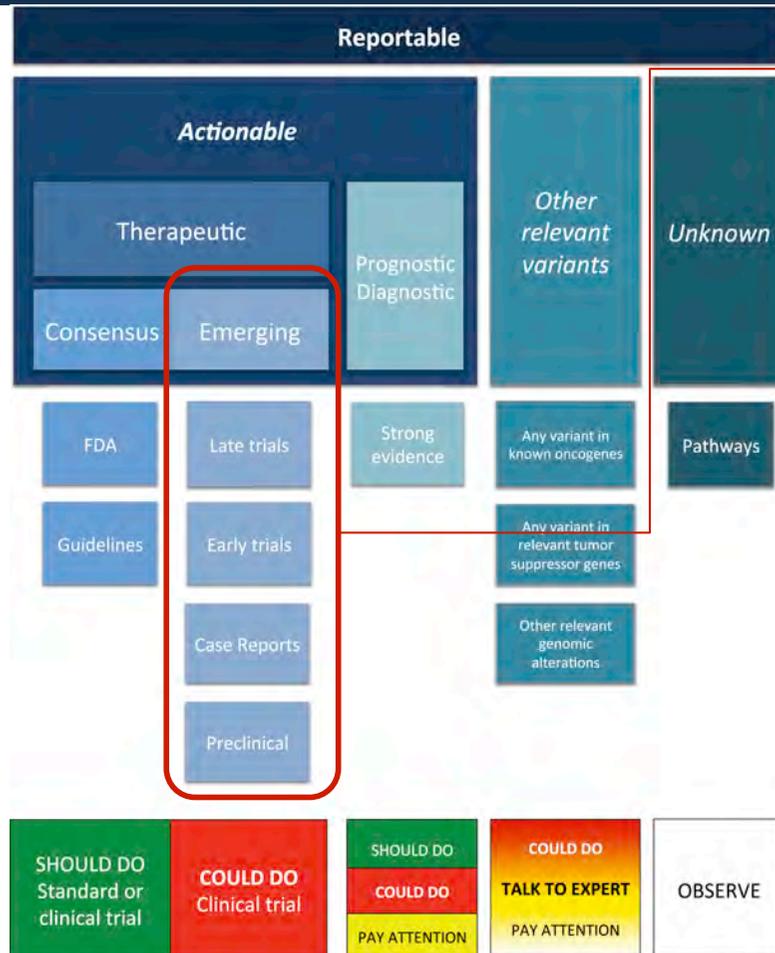
- EGFR, ALK
- ROS1, BRAF... Problème du remboursement

# Favoriser l'accès au traitement



Pas de traitement en dehors d'un essai

# Favoriser l'accès au traitement



## Discussion au cas par cas :

- Essai dès que possible
- Prescription hors-AMM à discuter en RCP en tenant compte:
  - Du niveau de preuve de l'activité du traitement envisagé
  - Des alternatives thérapeutiques

# Favoriser l'accès au traitement

## Prescription hors-AMM

**Principe** : La prescription d'une spécialité pharmaceutique doit être conforme à son AMM ou son ATU

**Dérogation** : La prescription d'une spécialité non conforme à son AMM ou ATU est possible si *en l'absence d'alternative médicamenteuse appropriée* :

- Une RTU (recommandation temporaire d'utilisation) est établie par l'ANSM
- Le **prescripteur le juge indispensable au regard des données acquises de la science**

En pratique :

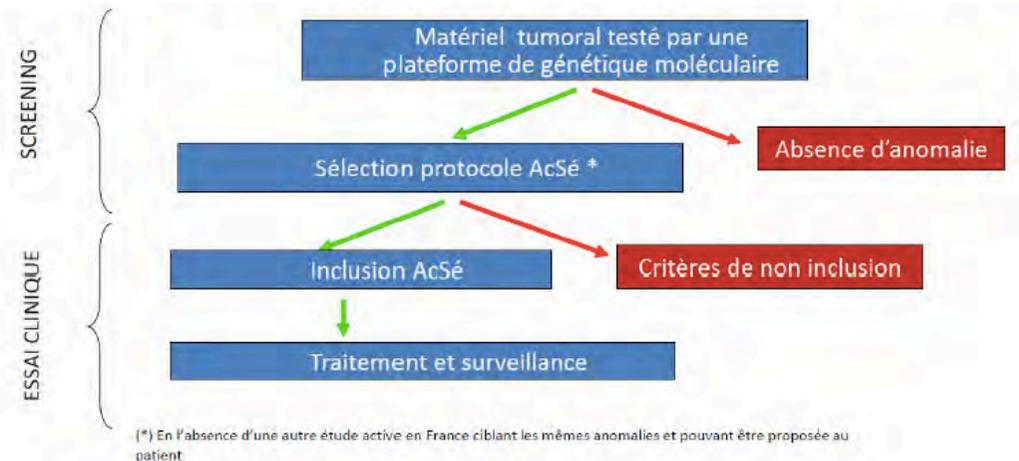
- les traitements standards doivent avoir été tentés auparavant
- l'information d'une prescription hors-AMM doit être donnée au patient et tracée dans le dossier

# Favoriser l'accès au traitement

## Accès aux traitements : programme AcSé

Modèle de collaboration avec les plateformes

|   |   |                                    |
|---|---|------------------------------------|
| <b>AcSé Moléculaire</b><br><i>ALK, MET, ROS, BRAF</i> | <b>AcSé Crizotinib</b><br>Essai   | <b>AcSé Vemurafenib</b><br>Essai   |
|   | 10000 à 18000 patients<br>14000 à 25000 tests   |                                    |
| <b>28 plateformes de génétique moléculaire INCa</b>   | 200 à 420 patients  |                                    |
|   |  promoteur | Jusqu'à 250 Centres investigateurs |

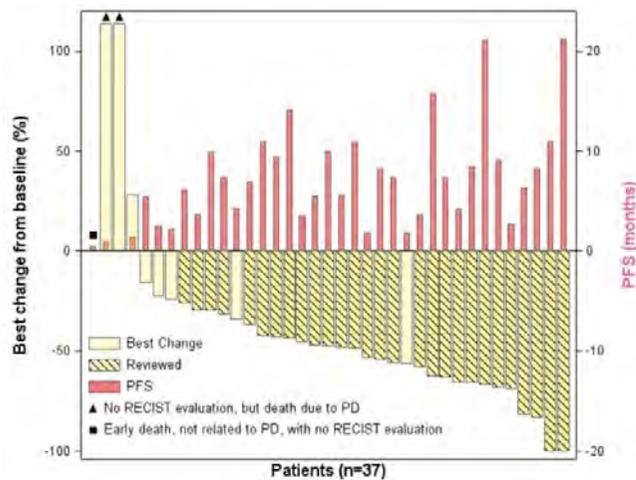


# Favoriser l'accès au traitement

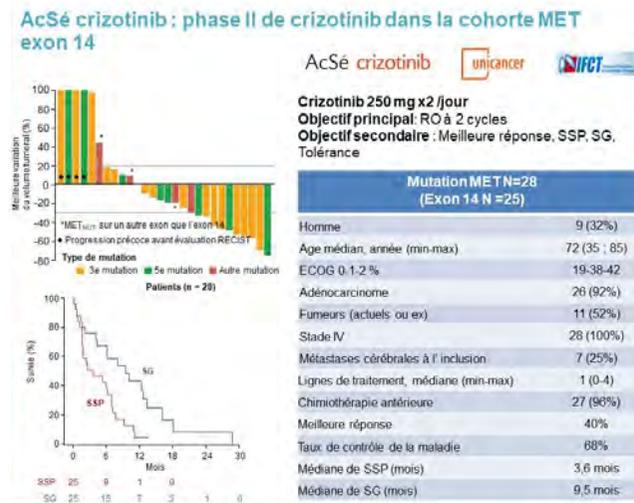
## Accès aux essais : programme AcSé

Exemple d'AcSé crizotinib et AcSé vemurafenib

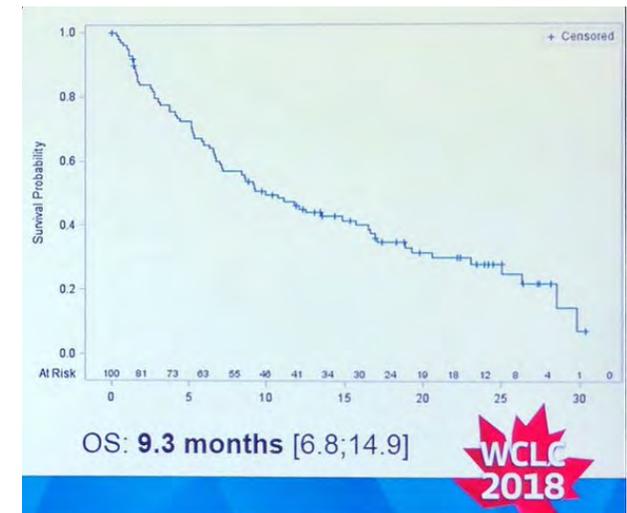
### ROS1



### MET exon 14



### BRAF



# Favoriser l'accès au traitement

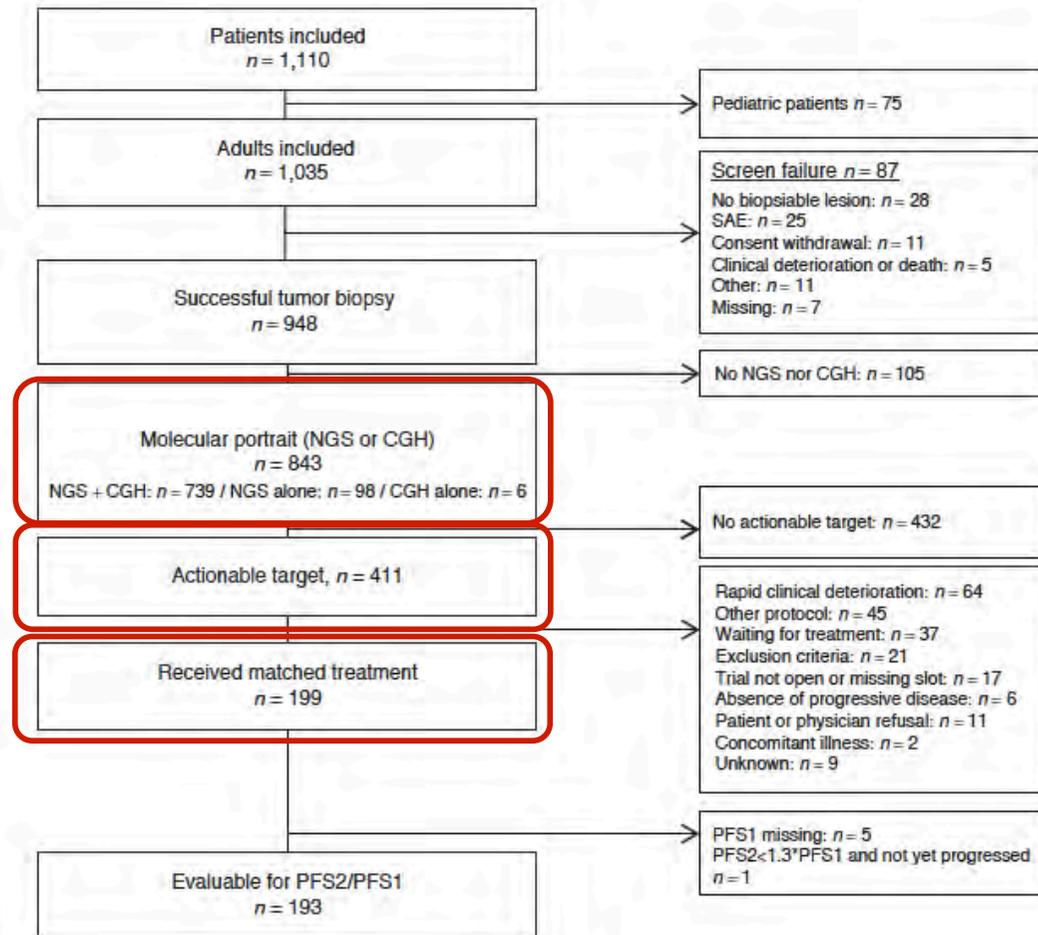
**Accès aux traitements : programmes de screening moléculaire avec orientation vers essais cliniques**

Exemple de l'essai **MOSCATO**

- Etude prospective
- Patients avec tout type de cancer, ayant déjà reçu une ligne de traitement, sans mutation connue accessible à une thérapie ciblée  
Analyse NGS ciblé + CGH (amplifications/délétions) + RNA seq
- Objectif : démontrer une amélioration de la PFS sous traitement guidé par la biologie moléculaire par rapport à la PFS précédente

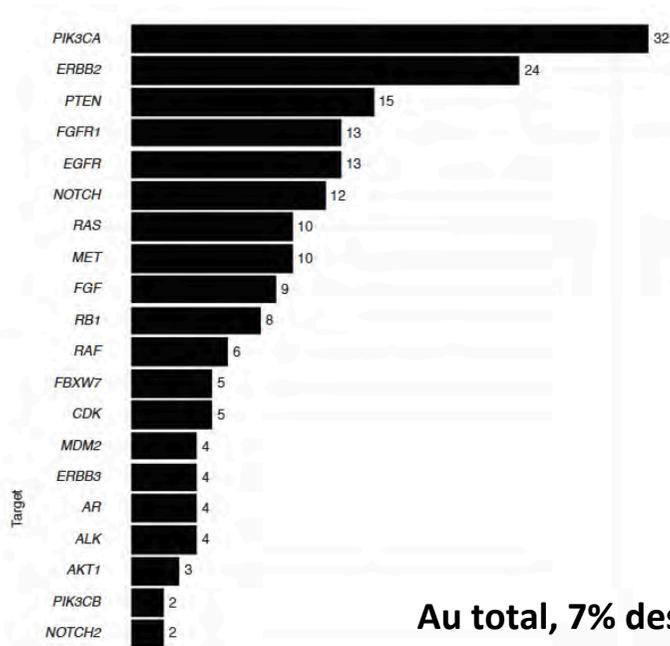
# Favoriser l'accès au traitement

## Résultats

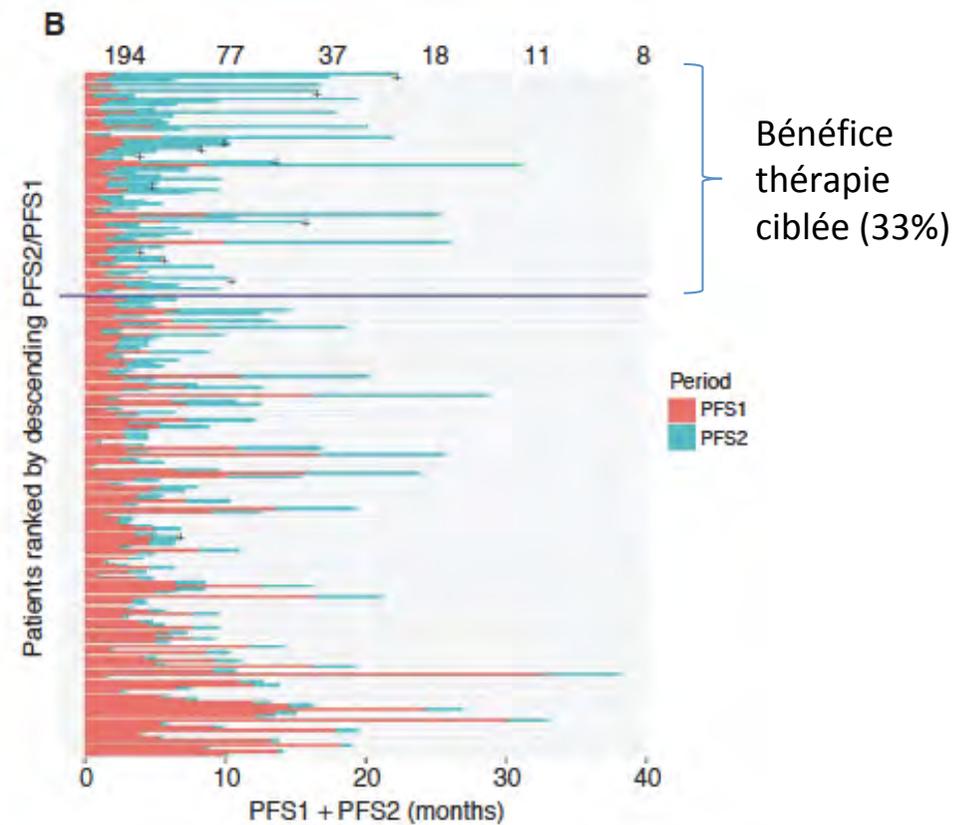


# Favoriser l'accès au traitement

## Résultats



**Au total, 7% des patients ont bénéficié de cette approche**



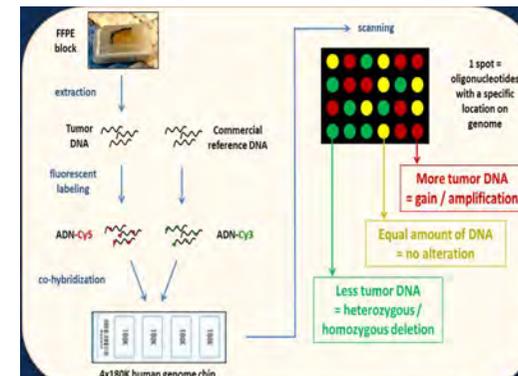
# Favoriser l'accès au traitement

Accès aux traitements : programmes de screening moléculaire avec orientation vers essais cliniques

Exemple de l'essai **PROFILER**

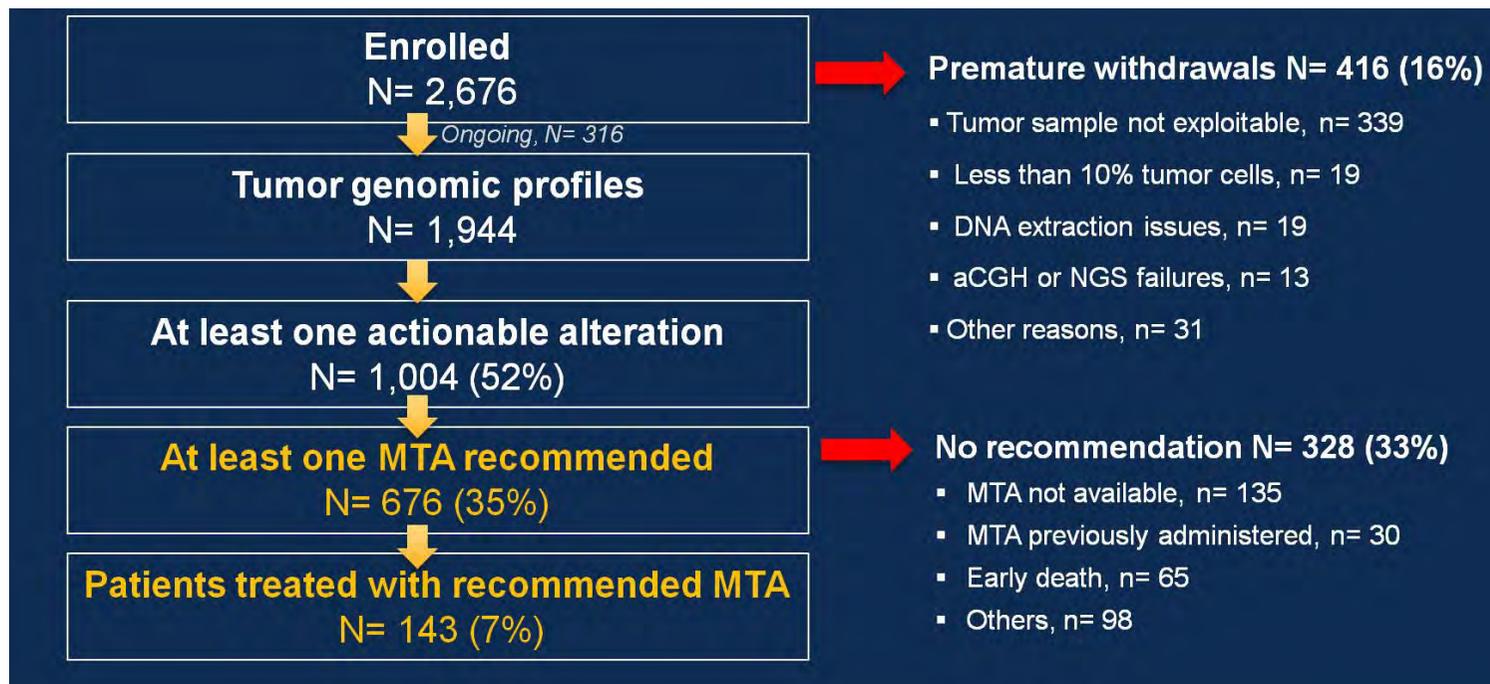
- Etude prospective
  - Patients avec tout type de cancer
  - Echantillon tumoral disponible
- Analyse NGS ciblé + CGH (amplifications/délétions)

|             |             |             |             |               |         |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|---------|-------|
| ABL1        | CSF1        | FGFR4       | KIT         | PDGFB         | ROR1    | SRC   |
| <b>AKT1</b> | CSF1R       | FLT1        | <b>KRAS</b> | PDGFRA        | ROR2    | STK11 |
| AKT2        | DDB2        | FLT3        | MERTK       | PDGFRB        | ROS1    | TEK   |
| ALK         | DDR1        | FLT4        | MET         | <b>PIK3CA</b> | RYK     | TIE1  |
| APC         | DDR2        | <b>GNAQ</b> | MPL         | PIK3R1        | SDHAF2  | TP53  |
| AXL         | <b>EGFR</b> | <b>HRAS</b> | MST1R       | PTCH1         | SDHB    | TSC1  |
| <b>BRAF</b> | ERBB2       | IGF1R       | MTOR        | PTEN          | SDHC    | TSC2  |
| BRCA1       | FGFR1       | JAK2        | MUSK        | RAF1          | SDHD    | TYRO3 |
| BRCA2       | FGFR2       | JAK3        | <b>NRAS</b> | RB1           | SMARCB1 | VHL   |
| CDKN2A      | FGFR3       | KDR         | PDGFA       | RET           | SMO     |       |



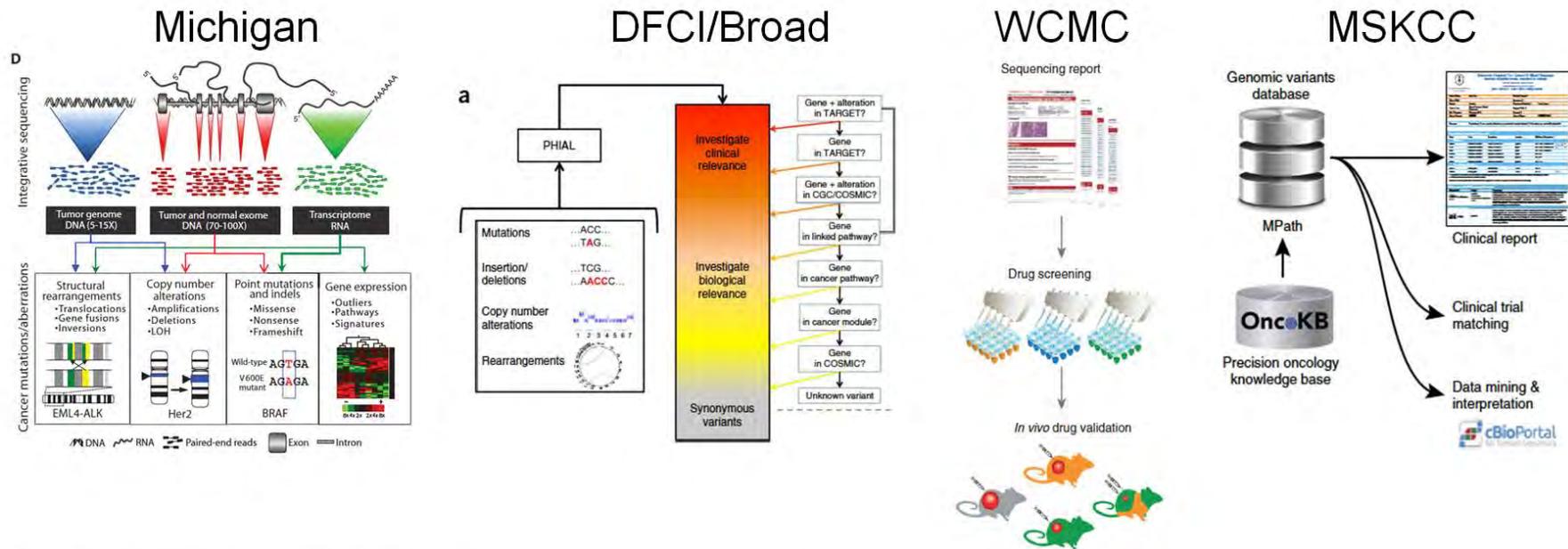
# Favoriser l'accès au traitement

## Résultats



# Favoriser l'accès au traitement

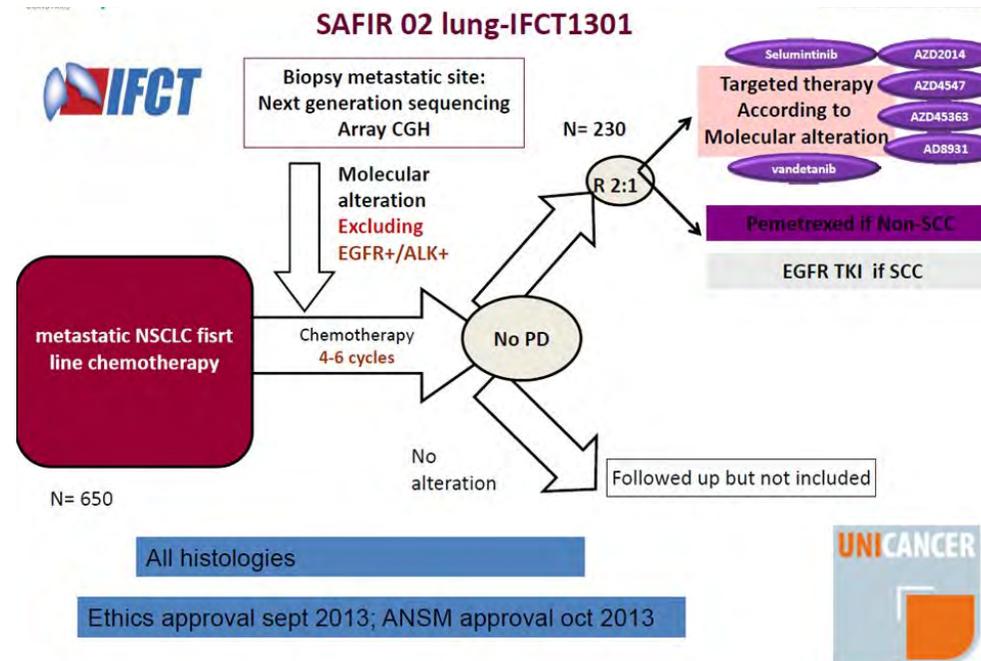
## Développement de programmes de screening moléculaire



# Favoriser l'accès au traitement

**Challenge : développement d'essais capables de démontrer l'intérêt d'un traitement guidé par la biologie moléculaire**

Exemple de l'essai SAFIR02



# Conclusion

- Le séquençage à haut débit est une opportunité de détecter plus de cibles accessibles à une thérapie ciblée
- Une validation préclinique de l'intérêt des cibles identifiées est une étape indispensable
- Les résultats de séquençage haut débit doivent être discutés en RCP moléculaire
- La priorité doit être donnée vers l'orientation en essai clinique. Les prescriptions hors-AMM sont envisageables en l'absence d'alternative thérapeutique
- Des essais de validation de l'intérêt du guidage moléculaire pour la décision thérapeutique sont en cours