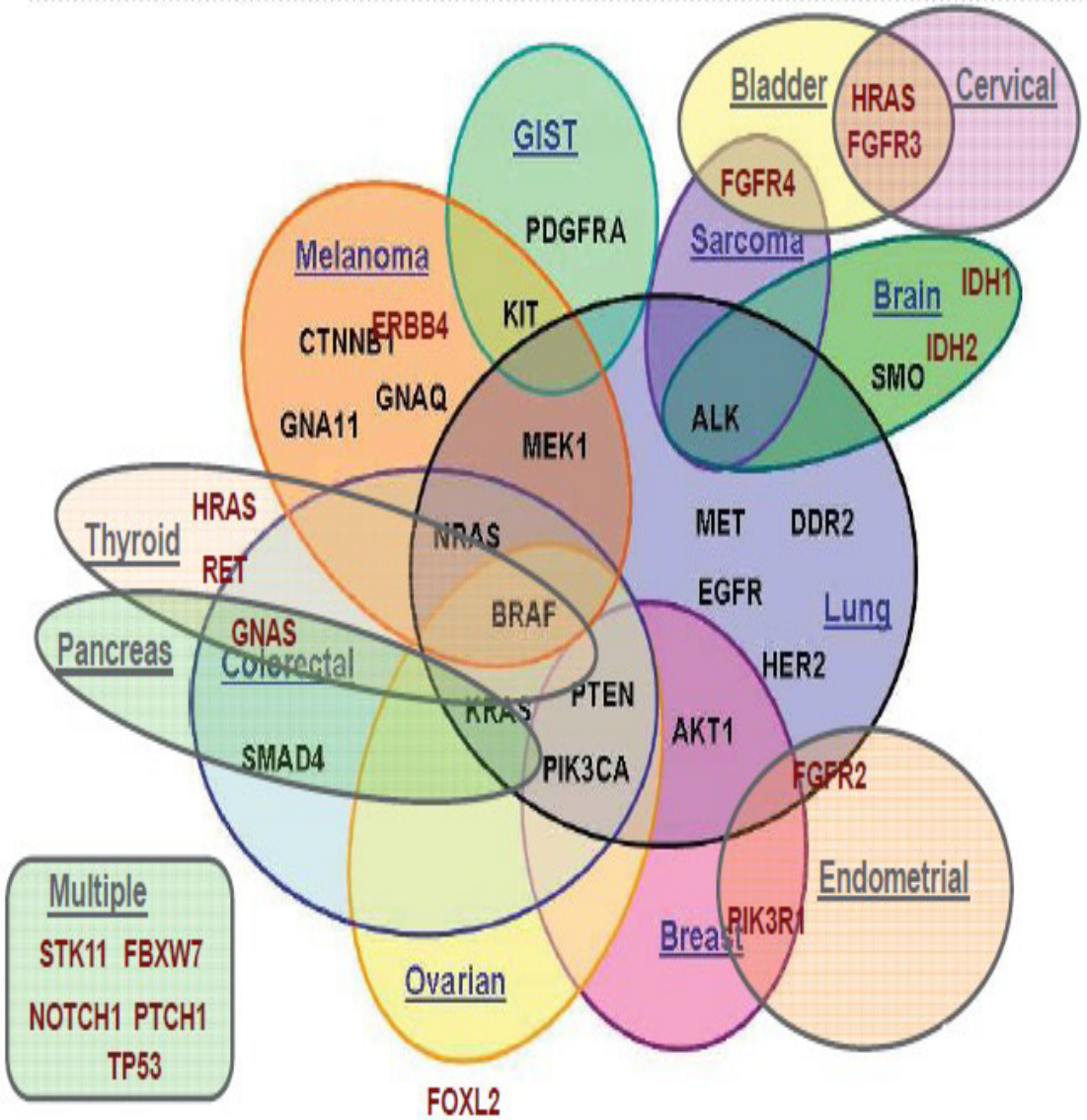
Le cancer bronchopulmonaire : l'apport de la biologie moléculaire

DR NATHALIE THEOU-ANTON
HUPNVS – DÉPARTEMENT DE GÉNÉTIQUE
PR C. BOILEAU
SECTEUR SOMATIQUE

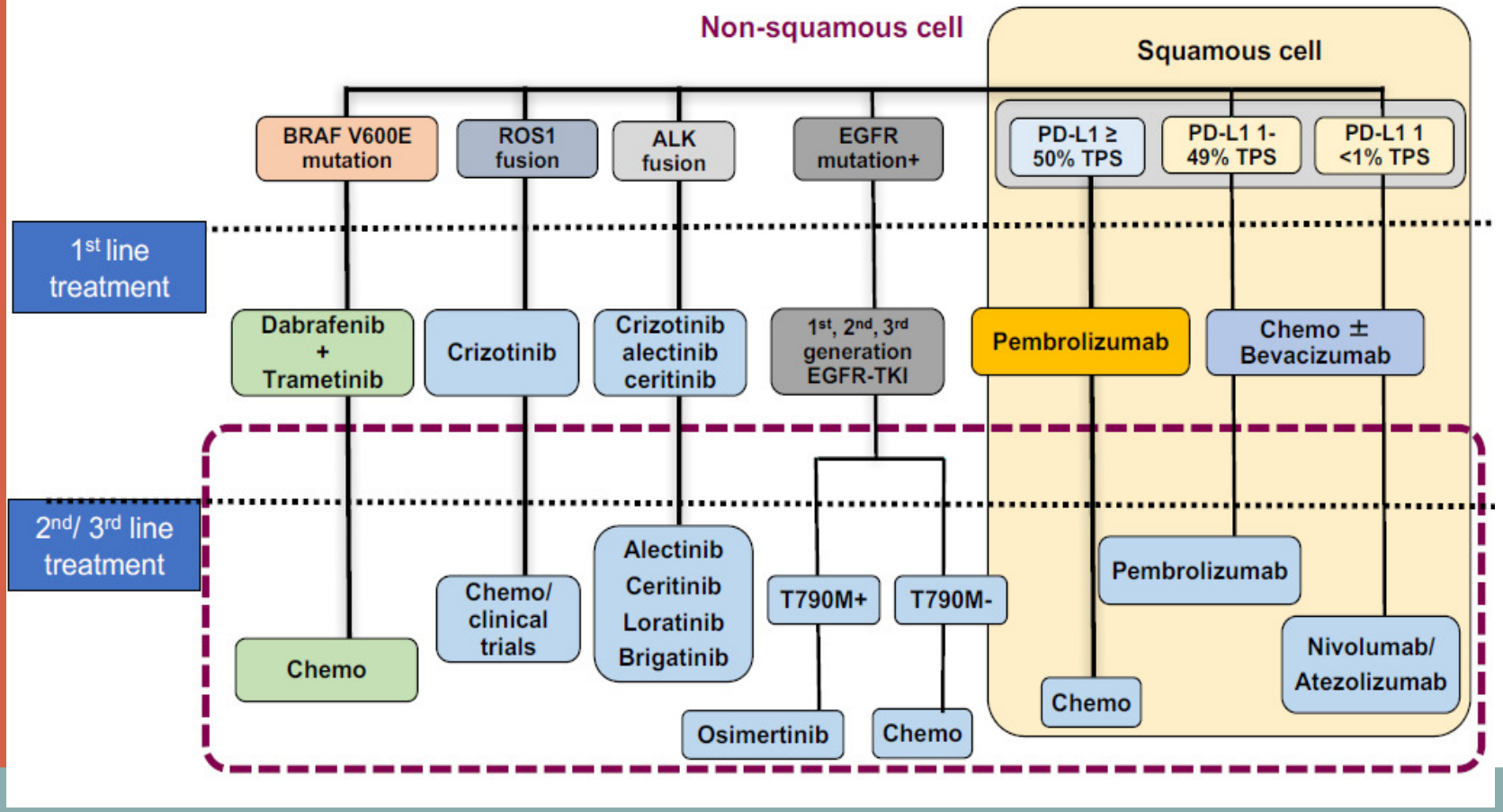
1- Explosion de nombre de biomarqueur dans les cancers

Pourquoi de la BM ?



2- ↗ AMM de nombreuses thérapies ciblées

+ PROGRAMME ACSE : mutation ALK, MET (y compris épissage), amplification



Effectuer la demande

TISSU = Anapath

Biopsie liquide = clinicien

BCH-GENETIQUE

Demande de recherche moléculaire en oncogénétique somatique sur les tissus

Ref : PN_PRA_E_014_04
Version : 04
Applicable le : 01-02-2016

HUPNVS - PLATEFORME ONCOMOLPATH

DEPARTEMENT DE GENETIQUE (Pr C. Boileau) : Dr N. Theou-Anton - Dr J.Lamoril - Pr. N. Souifi
DEPARTEMENT DE PATHOLOGIE (Pr. P. Bedossa) : Pr. A Couvelard (BCH) - Dr N.Guedj (BIN) - Dr M.Crossin (LM)
Lien a notre catalogue des examens : http://triweb.bch.aphp.fr/TRIWEB/catlabo/phb/accueil_hupnvs.php

PATIENT (ou ETIQUETTE)

Nom : .....
Nom de jeune fille : .....
Prénom : ..... Sexe : .....
Date de naissance : ..... /..... /.....

Etiquette patient avec **NIP**

PRELEVEMENT : *A envoyer au Dr N.THEOU-ANTON ou Dr J.LAMORIL– Département Génétique 3ème étage (Réception Biochimie) – Hôpital Bichat-Claude Bernard – 46 rue Henri Huchard – 75877 Paris Cedex 18* TEL : 01 40 25 78 85/FAX : 01.40.25.87.85

☐ Tissu fixé (bloc paraffine) :
- ☐ SI >50% de cellules tumorales : 6 coupes de 5 µm (copeaux dans un tube de 1.5 ml bandelock).
- ☐ SI <50% de cellules tumorales : 4 coupes de 10 µm sur lames. Cercler la zone d'intérêt (sous lame) ou 1HPS annoté.

(Remarque : si ARN + ADN, 1 tube supplémentaire de 3 coupes de 5µm ou 3 lames supplémentaires pour l'ARN)

☐ Tissu congelé : Faire **4 coupes de 10 µm** de tissu congelé (ou environ 3 à 5 mm3) dans un cryotube (dans carboglace ou azote).

☐ ADN *(Technique extraction ..... ; Concentration : ..... ; Volume : .....)*

MEDECIN PRESCRIPTEUR (coordonnées précises) - les résultats seront communiqués au médecin prescripteur

Nom et Prénom : .....
N° RPPS (hors APHP) ou Code APH (APHP) : .....
Adresse : .....
Téléphone : ..... Fax : .....

Cachet du service ou Etiquette **UH** 6digit (Obligatoire pour service APHP)

PATHOLOGISTE DEMANDEUR (une copie du résultat sera adressée au pathologiste demandeur)

Nom : .....
Adresse : .....
Tél : ..... Fax : ..... Mail crypté : .....

RENSEIGNEMENTS ANATOMO-CYTO-PATHOLOGIQUES (merci de joindre une copie du compte rendu anapath)

N° de CR anapath et n° de bloc : ..... Etat tumoral : ☐ Tumeur Primitive ou ☐ Métastase
Site de prélèvement : .....
Type de prélèvement : ☐ Biopsie ☐ Pièce opératoire ☐ Cytologie (culot) ☐ Autres : .....
Type histologique de la tumeur : .....
% de cellules tumorales estimé : .....

PRESCRIPTION Secteur SO

DATE DE LA DEMANDE : ...../...../..... CONTEXTE DE LA DEMANDE : Urgent : ☐ oui ☐ non

☐ Recherche biomarqueurs cancer colorectal (TCOL) : mutations KRAS/NRAS (exons 2/3/4), BRAF (exons 11/15).

☐ Recherche biomarqueurs cancer Poumon (TPOUM) :
- ☐ ADN : mutations EGFR (ex 18 à 21), KRAS (ex 2/3/4), BRAF (ex 11/15), HER2 (ins. ex 20)
- ☐ ARN : transcrits fusions ALK, ROS, RET, NRTK

☐ Recherche biomarqueurs mélanome (TMEL) : mutations BRAF (exon 15), NRAS (exons 2/3/4).
➔ pour les mélanomes acrolentigineux, muqueux ou de Dubreuilh : ☐ mutations du gène KIT (exon 11, 13 et 17)

☐ Recherche biomarqueurs dans le cadre d'un autre type de cancer (TDIV/TPANC) : .....
☐ KRAS ☐ NRAS ☐ BRAF ☐ PIK3CA ☐ EGFR ☐ KIT

Recherche d'une instabilité de microsatellites (MSI)/ phénotype RER : *Préciser l'indication de la recherche*
- ☐ Consultation oncogénétique
- ☐ Cancer colorectal ou endomètre avant 70 ans *(recommandations européennes : gut 2013)*
- ☐ Cancer colorectal + Cancer du spectre large du syndrome de lynch (même patient ou 2 apparentés 1er degré)

Spectre large du syndrome de lynch : colorectal, intestin grêle, endomètre, urothélium (rein, uretères, vessie), estomac, foie, voies biliaires, pancréas, glioblastome, ovaire, tumeurs cutanées (sébomes ou carcinomes sébacés, syndrome de Torre-Muir).
- ☐ Autre (à préciser) : .....

Page 1 sur 1

HU

DEPARTEMENT DE GENETIQUE (Pr C. Boileau) : Dr N. Theou-Anton - Dr J.Lamoril – Pr. N. Souifi
Lien a notre catalogue des examens : http://triweb.bch.aphp.fr/TRIWEB/catlabo/phb/accueil_hupnvs.php

PATIENT (ou ETIQUETTE)

Nom : .....
Nom de jeune fille : .....
Prénom : .....
Date de naissance : ..... /.....

OLE

Réception Extraction

- Enregistrement SGL
- Prétraitement
  - FFPE
  - Tubes BCT
- Extraction FFPE
  - ADN
  - ARN
- Extraction liquides pleuraux/ascites/LCR
  - ADN Cellules (culot)
- Extraction ADN circulant
  - Plasma
  - LCR

- FFPE : prétraitement over night
- 30 à 45 min : automate maxwell

- Kit manuel ADN circulant 2-3h

Circuit prélèvement +++
Identification patient et prescripteur

Organisation actuelle

Séquenceurs

Recherche Biomarqueurs toutes pathologies

1

Si urgence = kit ciblée
EGFR : 29 mutations
KRAS :19 mutations
NRAS : 16 mutations
BRAF V600 : 6 mutations

1

NGS ADN

2016 PGM
2017 S5XL

2

NGS ARN
K Poumons
Si IHC positive ou douteuse sur ALK/ROS
Si résultats NEG sur NGS ADN et IHC (RET/NRTK1)

Biopsie liquide

Tenon

1

MSI

BAT25, BAT26, NR21, NR24 et NR27

2

MLH1

LC 480

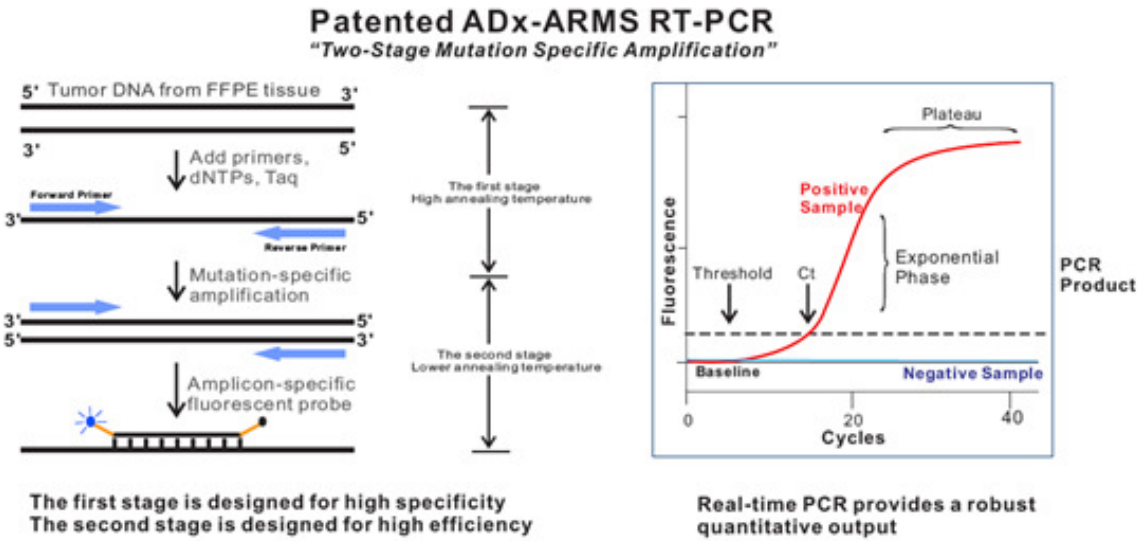
S5XL : 1 à 15Gb

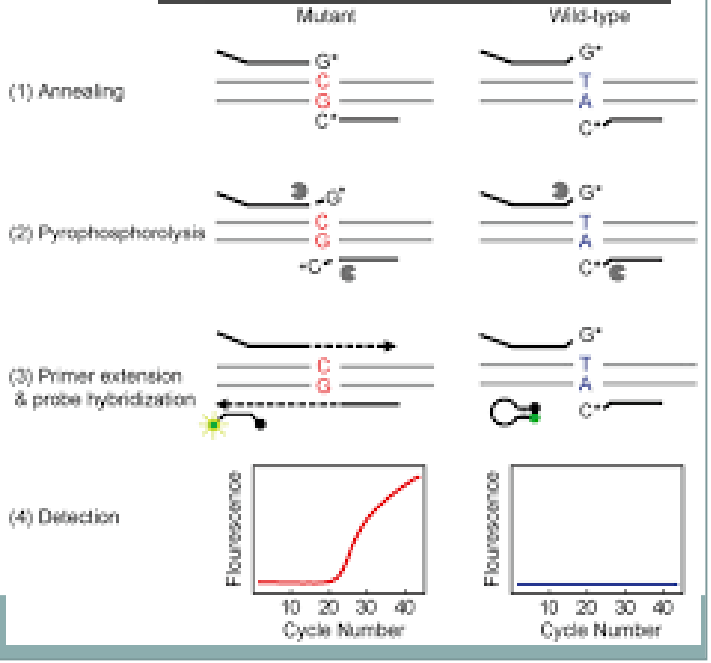
Lundi = Extraction → **Mardi soir/merc = kit rapide** → **Vend = NGS**

KIT Ciblé CEIVD:

- EGFR : 29 MUTATIONS
- BRAF V600: 6 MUTATIONS
- KRAS : 19 MUTATIONS
- NRAS: 16 MUTATIONS

1 à 2% sensibilité





NGS : Panel utilisé actuellement sur ADN
= 25 gènes (dont 16 gènes INCA)

Oncomine solid tumour DNA = OST (22 gènes) depuis 02/2016

AKT1	FGFR2	NRAS
ALK	FGFR1	
BRAF	FGFR3	PIK3CA
CTNNB1		PTEN
DDR2		SMAD4
EGFR	KRAS	
ERBB2	MAP2K1	STK11
ERBB4	MET	TP53
FBXW7	NOTCH	

Input = 10ng ADNg

Panel Complémentaire = OST +
depuis **02/2017**

HRAS	KIT
FGFR2	
PDGFRA	
ALK	MET
ERBB4	

Input = 10ng ADNg

118 AMPLICONS

Recherche de transcrits de Fusion - NGS

CE-IVD Oncomine™ Solid Tumour Fusion Transcript

Sample Type/ Input	• 10ng FFPE RNA
Genes Covered	• ALK, RET, ROS1 and NTRK1 genes
Primer pairs/ amplicons	• 83 pairs of primers in a single pool • average length of 138 bp

3' Gene	5' Partners	Variants (N.) *
ALK	EML4, HIP1, KIF5B, KLC1, TPR	17 + isoforms
ROS1	CD74, EZR, GOPC, LRIG3, SDC4, SLC34A2, TPM3	14 + isoforms
RET	CCDC6, CUX1, KIF5B	8 + isoforms
NTRK1	CEL, NFASC, IRF2BP2, TFG, QSTM1, SSBP2, DYNC2H1, CD74, MPRIP	11 + isoforms

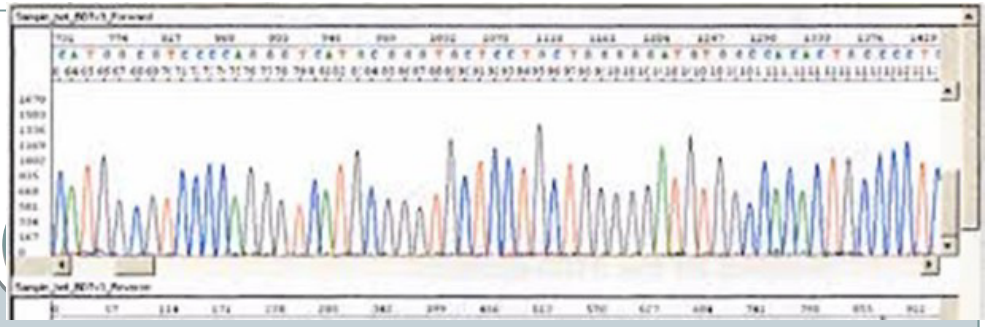
Résultats patient NGS

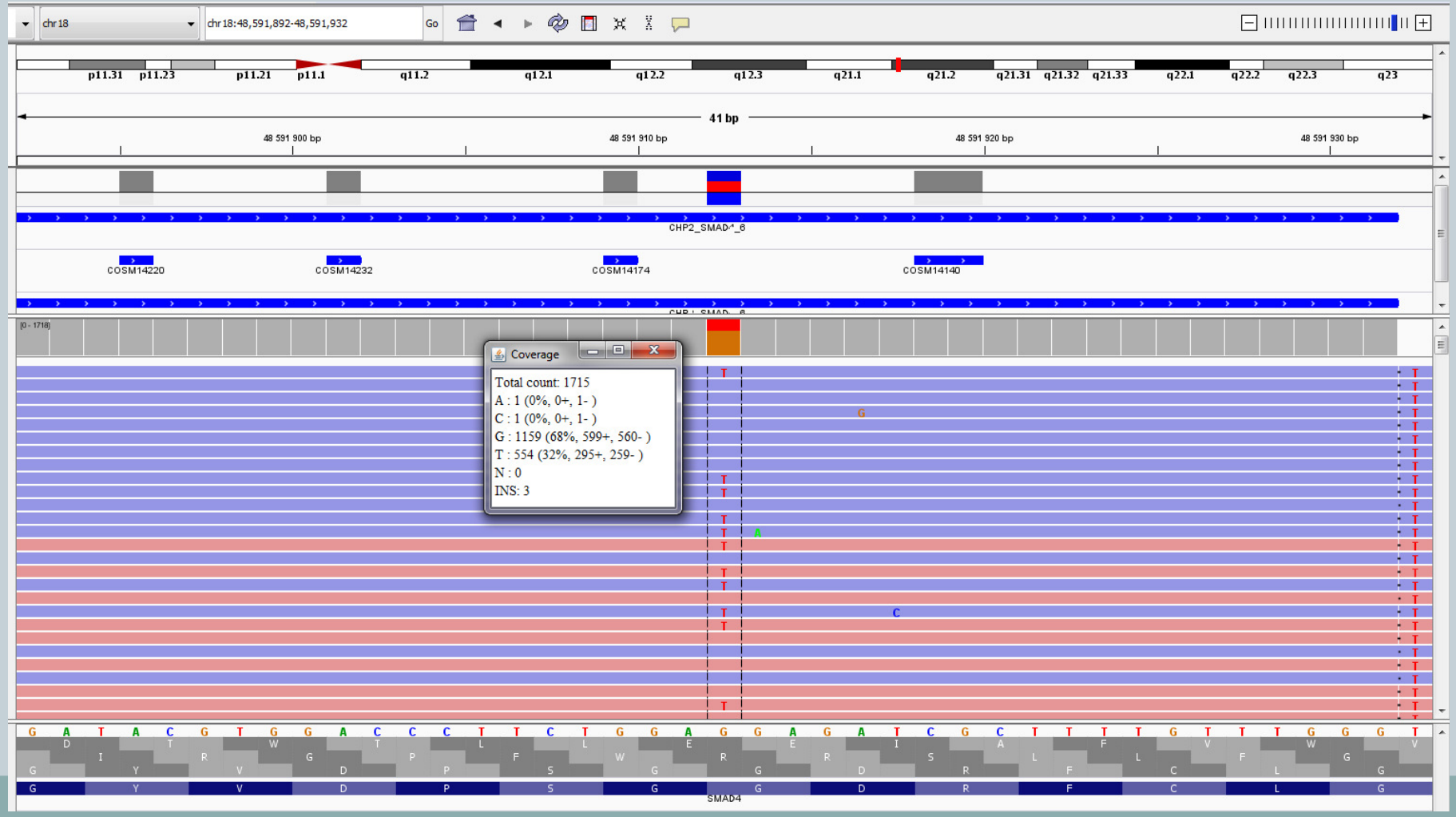
- **<u>2 logiciels analyse/annotation:</u>**
  - **Variant caller** : paramètres custom (fichier BAM, vcf, excel)
  - **Ion reporter** : paramètres custom (fichier excel)
  - **ALAMUT**

Locus	Genotype	Ref									
chr3:178952074	G/T	G									
chr4:1807894	A/A	G									
chr7:55239059	T/T	A									

Résultats NGS

IGV/alamut : Visualisation fichier BAM





Compte –rendu

- **Délai entre 4 et 15 jours (moyenne 9 jours)**
- **Papier** envoyés au clinicien prescripteur et anapath
- Envoyé dans **STARE (3 mois)** → **ORBIS**

Site : Bichat | UM de travail : GENETIQUE MOLECULAIRE | UF Prescriptrice : Toutes | Patient : Aucun

En cours Labo

Resultat de la recherche avancée. (en gras : au moins une analyse hors norme) — Recherche avancée

U	Patient	Analyse(s) et PRESCRIPTEUR	N° Dem				
	LAILLET PATRICK 16/01/1941	cliquez sur le lien pour affiche résultat génétique somatique (BCH)	8274611	Prélevé le 04/12/2017 00:00		+	

ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS
Hôpitaux Universitaires Paris Nord - Val de Seine
Département de Génétique
Oncogénétique Somatique
Dr. N. THEOU-ANTON / Dr. J. LAMORIL / Dr. N. SOUFIR
Tel: 01 40 25 85 51 / 88 51 - Fax: 01 40 25 87 85

Sexe : M

GH HUPNVS : BICHAT - CLAUDE BERNARD
Hospi Gastro-Entero 1
TOUR - 13 EME OUEST GASTRO.
A l'attention de : Gael GOUJON
46, rue Henri Huchard
75018 PARIS

10072940
Date de saisie : 22/10/15
Heure de saisie : 16h56
Date de prélèvement :
Heure de prélèvement : 10h51

cliquez sur le lien pour afficher l'image :

Secteur Oncogénétique Somatique

Ce CR est un duplicata, l'original du compte-rendu vous parviendra par courrier
file://glims_bjn.bbs.aphp.fr/GENNO_PDF/3420B0043D95C44C935CE660420304OE.PDF
Compte-rendu du : 09/11/2015 à 12:00

Programme ACSE 1 et 2: financé par l'INCA réalisé en partie par la plateforme

- AcSé 1: crizotinib
  - 2013-31/07/2017: 23 cohortes avec biomarqueurs
  - prolongation de 6 mois jusqu'en Février 2018 pour 2 cohortes (K oeso-gastrique & Tumeur myofibroblastique)
- AcSé 1: vemurafenib
  - 2015-2017:11 cohortes avec biomarqueur prolongation de 1 an jusqu'en octobre 2018 pour 10 cohortes (stop: K poumon)
- AcSé 2: immunothérapie
  - Ouverture Mai 2017 pour 3 ans :
    - Nivolumab: 5 cohortes dont une cohorte avec biomarqueur (MSI)
    - Pembroluzimab: 6 cohortes, sans biomarqueurs

ACSE 1 et 2

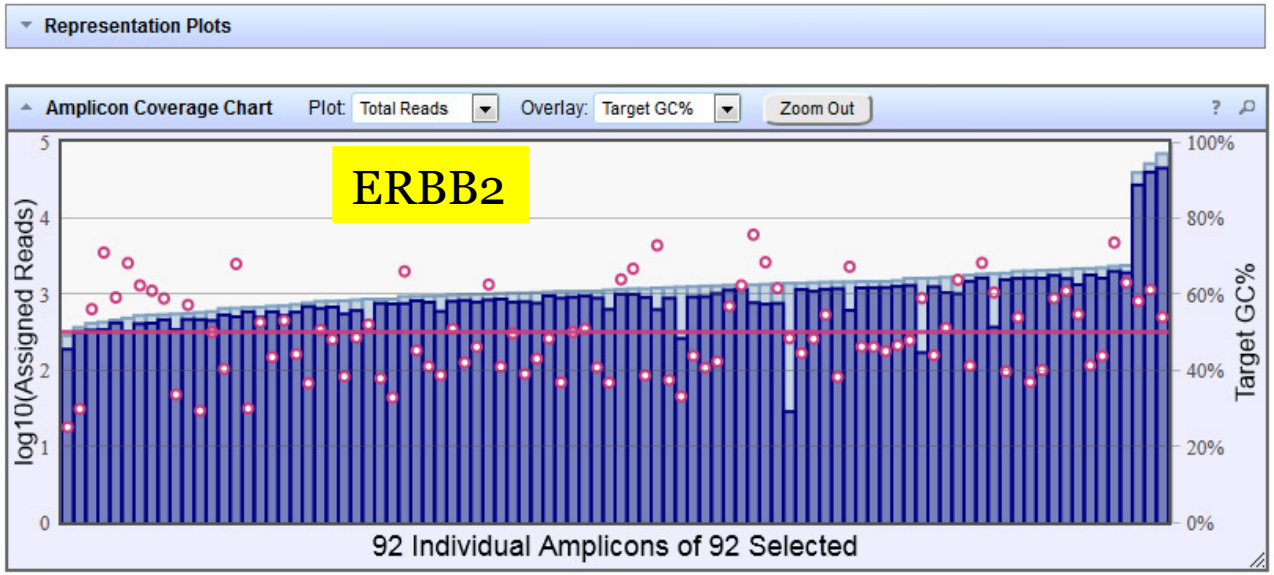
MOLECULE	CIBLE
NIVOLUMAB	PD1 (biomarqueur : MSI)
PEMBROLIZUMAB	PD1 (sans biomarqueur)

Type de cancer	[redacted]
Cholangiocarcinome et	[redacted]
Endomètre	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]

IHC (4 anticorps) + MSI (BM)

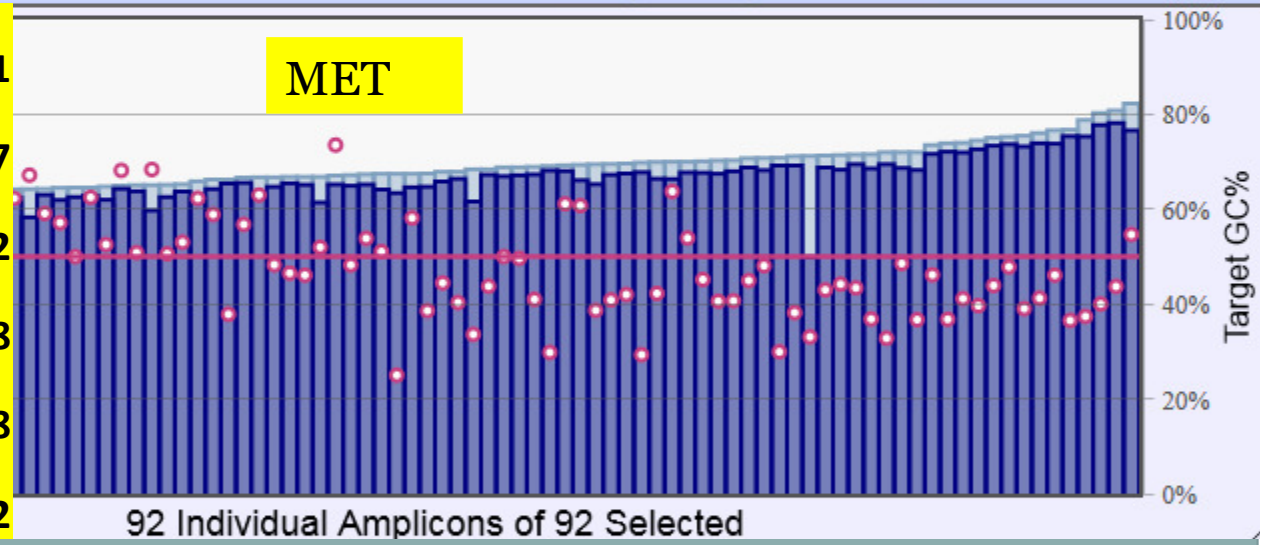
Tous les patients avec une déficience du MMR identifiée devront être orientés vers une consultation d'oncogénétique*.

PERSPECTIVES 1
détection/confirmation CNV



Développement algorythme CNV maison = Pre-Screening

chr7	**CHP2_MET_2**	**6791**
chr10	CHP2_PTEN_7	**6887**
chr7	**CHP2_MET_5**	**8712**
chr7	**CHP2_MET_6**	**10308**
chr7	**CHP2_MET_4**	**10978**
chr7	**CHP2_MET_1**	**12972**

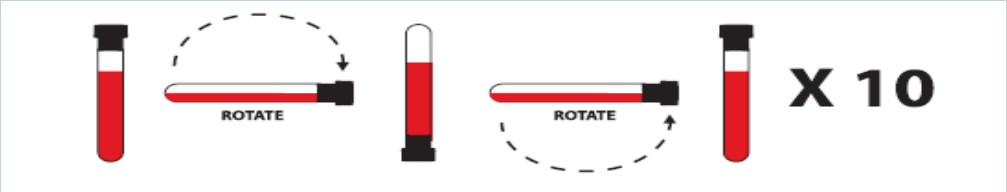


Préanalytique +++ 4 ml Plasma !!!

- **Tubes EDTA**

  - Centrifugation dans les 3 heures (El Messaoudi et al CCA 2013)

- **Tubes "Cell-free DNA"**
  - **Attention température ambiante +++ (jamais dans frigo !)**
  - Centrifugation dans les 7 **jours** (Denis et al Clin Chem 2015)



Techniques de détection

Une technique sensible !

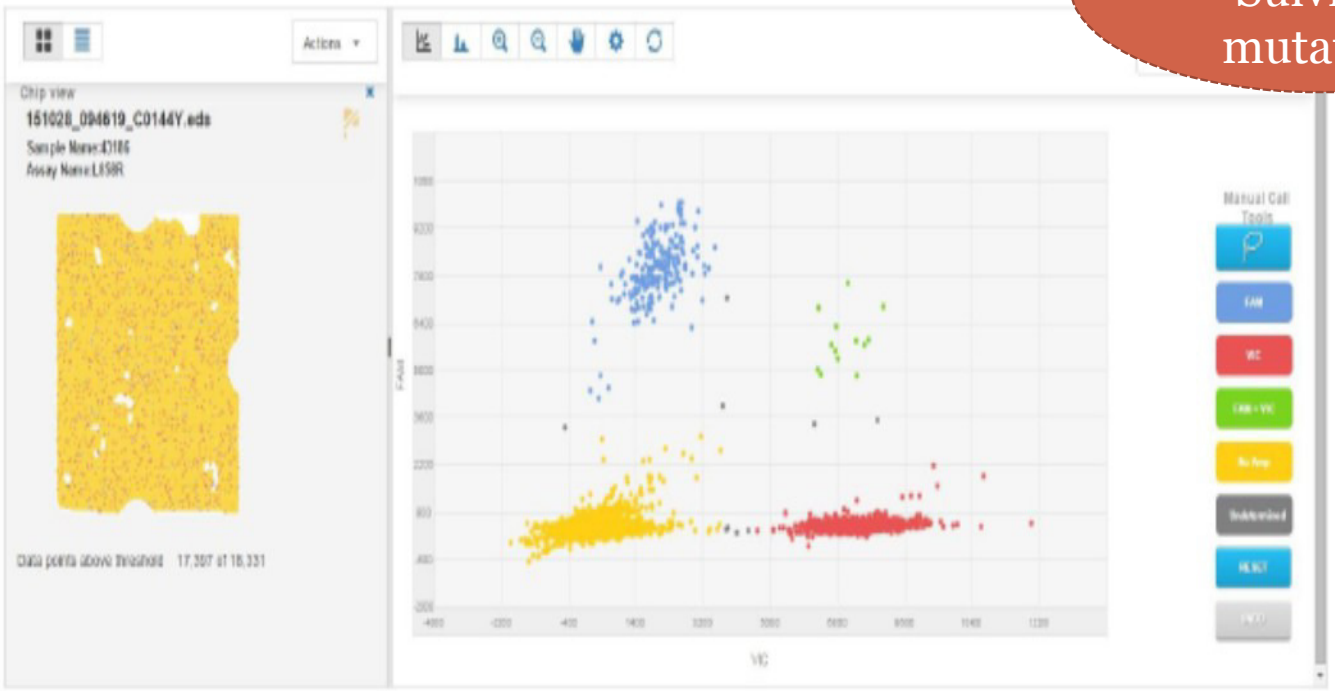
(<1% copies mutées)

- PCR spécifique d'allèle (ARMS) – 0,1-0,2%
- PCR digitale 0,01%
- Séquençage nouvelle génération (NGS) 2% à 0,1% (Technique spécifique ou algorythme spécifique)

Crowley et al. Nat Rev Clin Oncol 2013

QIAamp

Statut connu = Suivi de mutation



Target/total: 14.533%

AVANTAGE :
- Simple
- très sensible
- peu couteuse : 3-10 euros HT

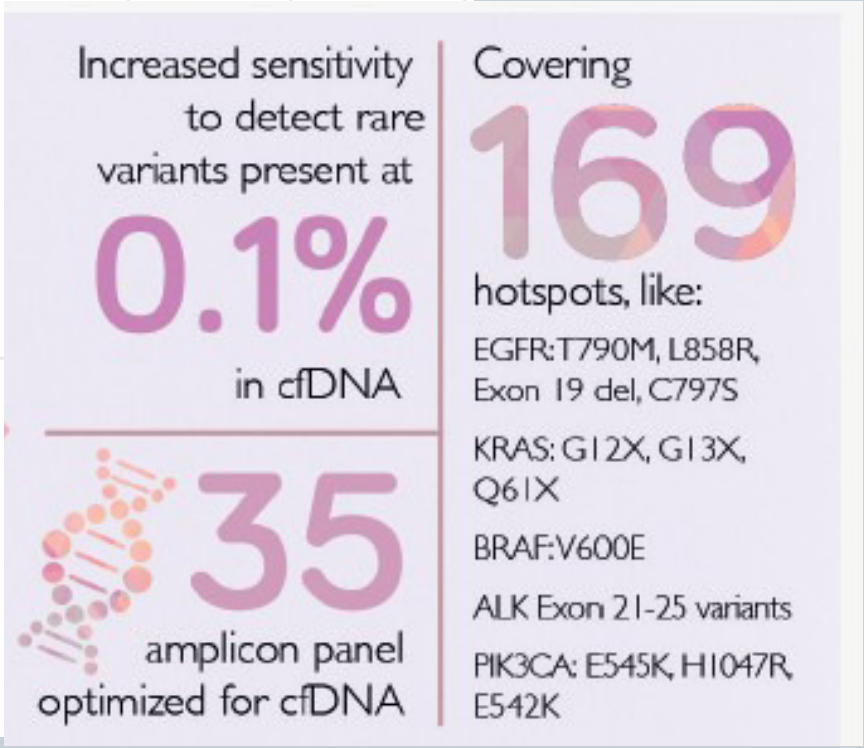
INCONVENIENT :
- recherche d'une cible ou cible par cible
- consommatrice ADN

KIT ADN circulant

Oncomine cell-free assay gene content

Assay	DNA/RNA	Gene	Selected SNV hotspots	CNVs	Fusions	Extras
Oncomine Lung cfTNA Assay	DNA & RNA	*ALK* *BRAF* *EGFR* *ERBB2* *KRAS* *MAP2K1* *MET* *NRAS* *PIK3CA* *RET* *ROS1* *TP53*	>150 hotspots including: *EGFR*: T790M, C797S, L858R, Exon 19 del *KRAS*: G12X, G13X, Q61X *BRAF*: V600E *ALK*: Exon 21-25 *PIK3CA*: E545K, H1047R, E542K	*MET*	*ALK*, *RET*, *ROS1*	*MET exon 14 skipping*
Oncomine Lung cfDNA Assay	DNA	*ALK* *BRAF* *EGFR* *ERBB2* *KRAS* *MAP2K1* *MET* *NRAS* *PIK3CA* *ROS1* *TP53*	>150 hotspots including: *EGFR*: T790M, C797S, L858R, Exon 19 del *KRAS*: G12X, G13X, Q61X *BRAF*: V600E *ALK*: Exon 21-25 *PIK3CA*: E545K, H1047R, E542K	---		

Statut inconnu



- AVANTAGES : recherche multicible, peu consommatrice adn (10-20ng)
- INCONVENIENTS : moins sensible, couteuse (340 euros)

PERSPECTIVES 3

RCP Moléculaire (2018)/ Sequoia (genome 2020)

Gene List for OCAv3: 20ng DNA & RNA (3800 & 867 amplicons)

Hotspot Genes (87)				Full-Length Genes (48)		Copy Number Genes (43)		Gene Fusions (Inter- and Intra-genic)	
AKT1	FGFR4	MED12	SRC	ARID1A	PALB2	AKT1	MDM2	AKT2	NF1
AKT2	FLT3	MET	STAT3	ATM	PIK3R1	AKT2	MDM4	ALK	NOTCH1
AKT3	FOXL2	MTOR	TERT	ATR	PMS2	AKT3	MET	AR	NOTCH4
ALK	GATA2	MYC	TOP1	ATRX	POLE	ALK	MYC	AXL	NRG1
AR	GNA11	MYCN	U2AF1	BAP1	PTCH1	AR	MYCL	BRAF	NTRK1
ARAF	GNAQ	MYD88	XPO1	BRCA1	PTEN	AXL	MYCN	BRCA1	NTRK2
AXL	GNAS	NFE2L2		BRCA2	RAD50	BRAF	NTRK1	BRCA2	NTRK3
BRAF	H3F3A	NRAS		CDK12	RAD51	CCND1	NTRK2	CDKN2A	NUTM1
BTK	HIST1H3B	NTRK1		CDKN1B	RAD51B	CCND2	NTRK3	EGFR	PDGFRA
CBL	HNF1A	NTRK2		CDKN2A	RAD51C	CCND3	PDGFRA	ERBB2	PDGFRB
CCND1	HRAS	NTRK3		CDKN2B	RAD51D	CCNE1	PDGFRB	ERBB4	PIK3CA
CDK4	IDH1	PDGFRA		CHEK1	RB1	CDK2	PIK3CA	ERG	PPARG
CDK6	IDH2	PDGFRB		CREBBP	RNF43	CDK4	PIK3CB	ESR1	PRKACA
CHEK2	JAK1	PIK3CA		FANCA	SETD2	CDK6	PPARG	ETV1	PRKACB
CSF1R	JAK2	PIK3CB		FANCD2	SLX4	EGFR	RICTOR	ETV4	PTEN
CTNNB1	JAK3	PPP2R1A		FANCI	SMARCA4	ERBB2	TERT	ETV5	RAD51B
DDR2	KDR	PTPN11		FBXW7	SMARCB1	ESR1		FGFR1	RAF1
EGFR	KIT	RAC1		MLH1	STK11	FGF19		FGFR2	RB1
ERBB2	KNSTRN	RAF1		MRE11A	TP53	FGF3		FGFR3	RELA
ERBB3	KRAS	RET		MSH2	TSC1	FGFR1		FGR	RET
ERBB4	MAGOH	RHEB		MSH6	TSC2	FGFR2		FLT3	ROS1
ERCC2	MAP2K1	RHOA		NBN		FGFR3		JAK2	RSPO2
ESR1	MAP2K2	ROS1		NF1		FGFR4		KRAS	RSPO3
EZH2	MAP2K4	SF3B1		NF2		FLT3		MDM4	TERT
FGFR1	MAPK1	SMAD4		NOTCH1		IGF1R		MET	
FGFR2	MAX	SMO		NOTCH2		KIT		MYB	
FGFR3	MDM4	SPOP		NOTCH3		KRAS		MYBL1	