

Le NGS en pratique clinique : l'expérience de Rennes



Jean Mosser
*Service de génétique moléculaire et génomique, CHU de Rennes
Oncogénomique translationnelle, IGDR, UMR6290, CNRS, Université de Rennes1
Plateforme Génomique environnementale et humaine, Université de rennes1, Biogenouest Génomique*

Déclarations d'intérêts

L'objectif de cette déclaration est d'exposer aux congressistes l'existence d'éventuels liens qui pourraient influencer, d'une façon ou d'une autre, votre intervention.

Conflits d'intérêts en rapport avec mon intervention

*BOEHRINGER
ASTRAZENECA
FLUIDIGM
ROCHE
SOFIA GENETICS*

Caractérisation des génomes tumoraux

- Identifier des cibles potentielles et/ou mutations de sensibilité
 - Ex : Mutations (EGFRs, BRAFV600, MET, BRCA, KIT...), Amplification (HER2...), Translocations (ALK, ROS1...)
- Identifier des mutations de résistance I ou II
 - Ex : Mutations EGFRr (TKI 1^e, 2^e et 3^e G), ALKr (TKI 1^e, 2^e et 3^e G), KRAS.....
- Contribuer au diagnostic
 - Ex : altérations IDH, 1p19q [gliomes diffus]
- Définir un risque pronostique particulier
 - Ex : Mutation BRAF [CCR], TERTp [gliome]
- Suivre le patient
 - Ex : Marqueur moléculaire de la maladie dans les effluents biologiques

Stratégie thérapeutique - Caractérisation moléculaire de la tumeur

Objectif : la médecine personnalisée

Réalisation des tests : 28 PF GMC INCa

Subvention de l'INCa pour la recherche de ces mutations (AMM, ATU, anticipation)

2008 : *K-RAS* / CCR métastatique – anticorps contre EGFR

2009 : *EGFR* / CBNPC – EGFR-TKI (gefitinib en 1^e ligne)

2011 : biomarqueurs émergents

2012 : translocations *ALK* / CBNPC - Crizotinib

2012 : *BRAF V600* / mélanome – Vemurafenib

2013 : programme AcSe : Basket : tumeur en échappement thérapeutique

2013 : *KRAS* AMM étendue (*NRAS*) / CCR métastatique – anticorps contre EGFR

Augmentation du nombre de tests : Ex. CBNPC : diagnostic 8 cibles, suivi : 35 cibles

Evolution du concept : Organe -> stratification moléculaire plus exhaustive (umbrella-basket)

Personnaliser la médecine en fonction de la stratification moléculaire tumorale

Au diagnostic : guider le traitement

Au suivi : adapter le traitement en fonction de la dynamique clonale de la tumeur

Technique de biologie moléculaire classique limitée en rendement et sensibilité

→ 2013 : AAP-INCa Transfert du NGS en diagnostic des cancers

PANEL INCa
panel NGS tumeurs solides
RIHN : NGS-K20

AAP INCa 2013 – volet 1&2

PANEL INCa : RATIONNEL

Intérêt clinique: **choisir les bonnes cibles**

diagnostiques (IDH) – théranostiques (BRAF) – prédictives (KRAS) – pronostiques (TERTp)

Simplification des procédures :

1 seule méthode un seul poste T dans plus de 80% des cas de prescription

Amélioration de l'information : *convergence d'info multiples > 1 info*

gain en **précision** - caractérisation moléculaire / médecine de précision

→ prise en charge des patients

Applicable en **routine**

Production quantité de données analysables en routine

Applicable au **diagnostic** et au **suivi** des patients sur FFPE et biopsies liquides

Le test NGS doit respecter les contraintes du diagnostic

- ✓ **Haut-débit** Nombre patients (60-80/semaine)
Nombre marqueurs (150 cibles - 30 gènes)
- ✓ **Rapide** Délais de rendu de résultat (7 – 10 jours)
- ✓ **Flexible** Evolution des thérapies ciblées – gestion des résistances
- ✓ **Econome** € (INCa, RIHN)
ADN Echantillons précieux (exérèse, biopsie, ponction...)
- ✓ **Sensible** 5% des prélèvements avec % cellules tumorales < 10%
ADNtc : proportion faible de l'ADN libre circulant
- ✓ **FFPE** Qualité et quantité d'ADN médiocre (20% [dsDNA] < 1ng/μl)
- ✓ **Altérations** Mutations, Délétions, Insertions, Translocation, CNV
- ✓ **Accréditation** ISO 15189

**Résultats interprétés bihebdomadaires* X patients/Y gènes sur FFPE
et... ADN tumoral circulant**

X : centre; Y : Kit; * production & bio-analyse automatisées

Panel de 20 gènes sur tous les patients: Régions d'intérêts

Gene	Exons
BRAF	Ex11 Ex15
EGFR	Ex18 Ex19 Ex20 Ex21
IDH1,2	Ex4
KRAS	Ex2 Ex3 Ex4
NRAS	Ex2 Ex3 Ex4
KIT	Ex11 Ex13 Ex17 Ex18
PDGFRA	Ex12 Ex14 Ex18



Gene	Exons
ALK	Ex22 Ex23 Ex24 Ex25 Ex26
MET	Ex2 Ex14 Ex16 Ex17 Ex18 Ex19 Ex20

Programme Basket
AcSe

Gene	Exons
AKT1	Ex3
CTNNB1	Ex3
ERBB2	Ex20
ERBB4	Ex10 Ex12
FGFR2	Ex7 Ex9 Ex12 Ex14
FGFR3	Ex7 Ex9 Ex14 Ex16
HRAS	Ex2 Ex3 Ex4
KIT	Ex8 Ex9 Ex14
MAP2K1	Ex2
PIK3CA**	Ex10 Ex21
PTEN	Ex7

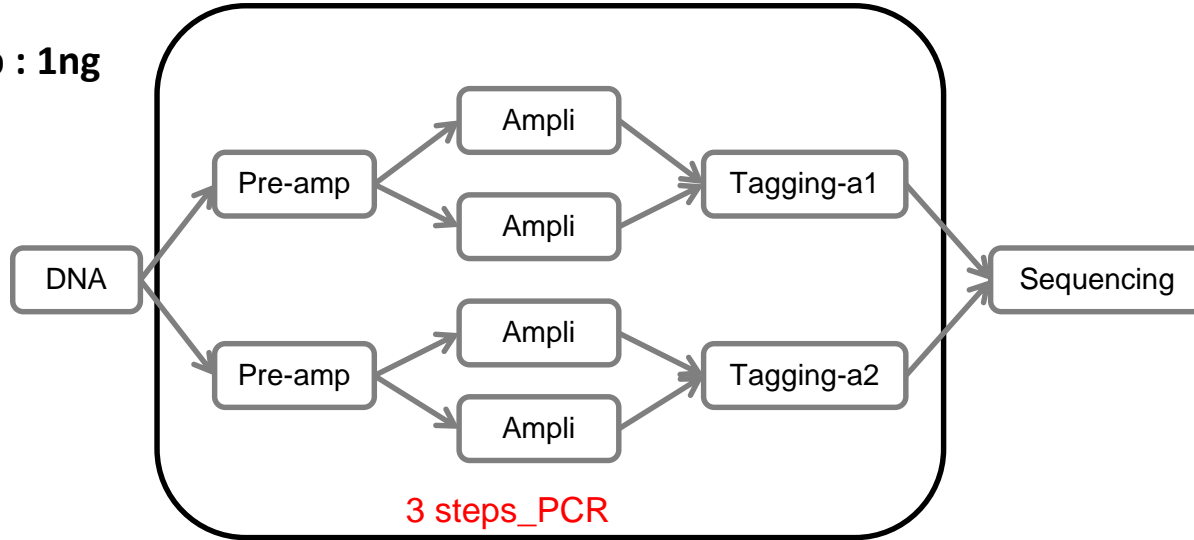
→ Marqueurs **référéncés**
(AMM, ATU, classification)

→ Biomarqueurs **non référéncés** émergents
→ Biomarqueurs de **résistance TKI**

→ Guider la thérapie au D et au suivi et inclusion éventuelle dans des essai cliniques

Duplication – 3 étapes

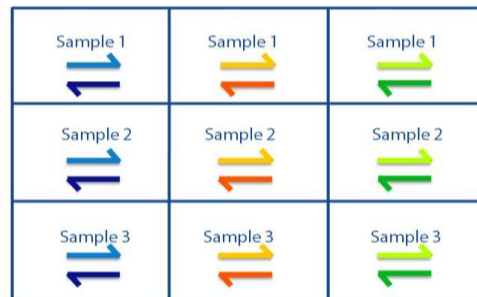
2x150 copies ADNdb : 1ng
Amplicon < 150 pb



Pre-Amplification

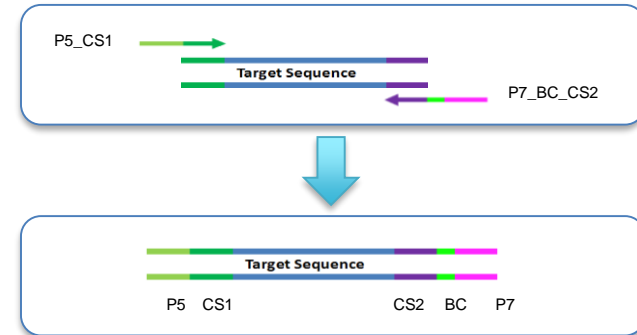


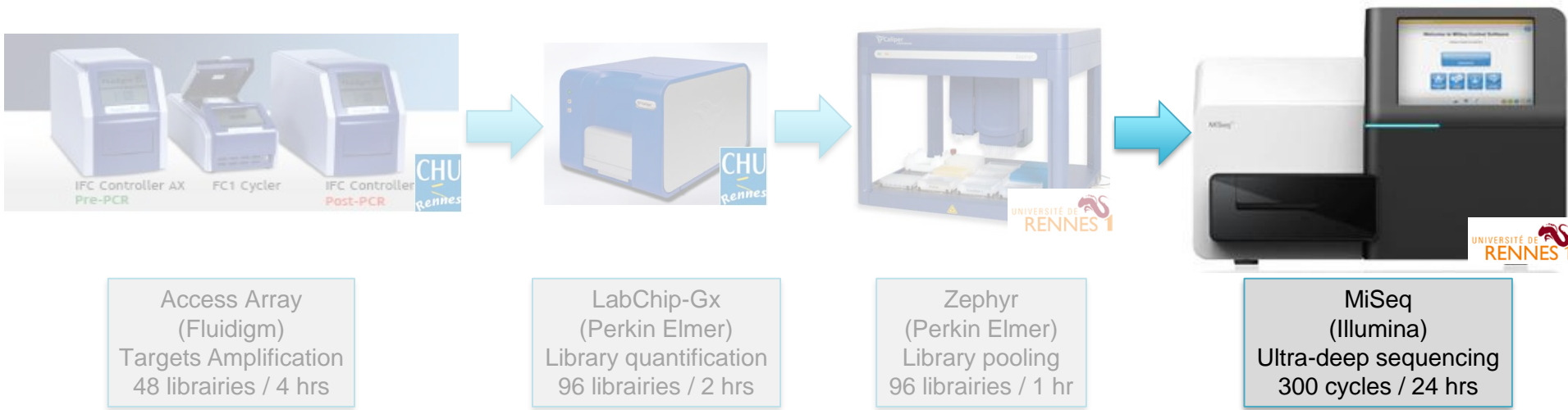
Amplification (2304 wells)



fluidigm access array

Tagging

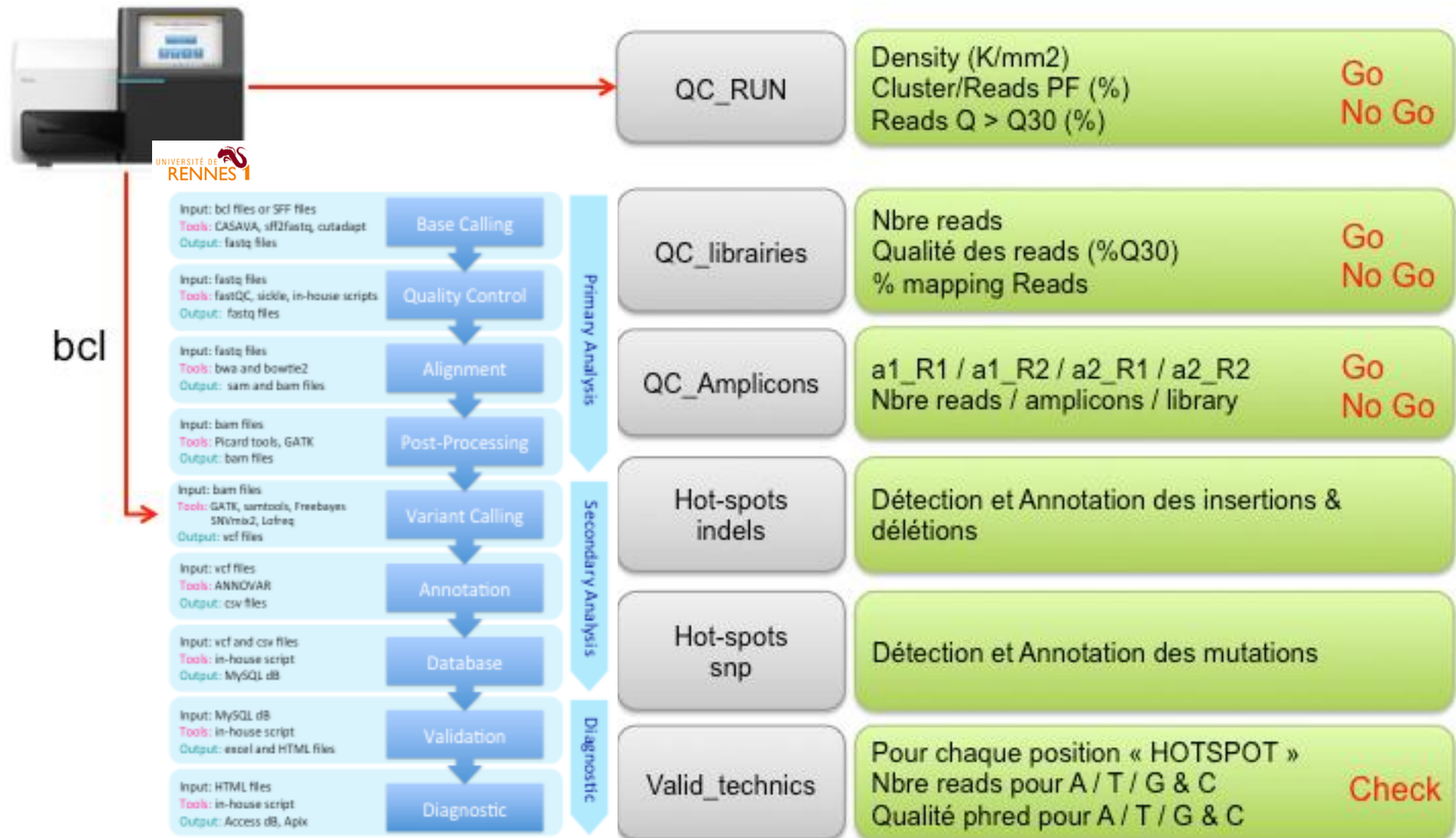




2 x 150pb

ANALYSE DES DONNES VALIDATION [AF variable]

Analyse



For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures

2014 : le NGS est en routine sur échantillons tumoraux

NGS comparé aux techniques classiques de diagnostic (pyroséquencage + ARMS)

Sensibilité 77,4%
Spécificité 98,4%

CTRL : 584
FFPE: 3366

Seuil de détection 2%
Sensibilité 99,9%
Spécificité 99,9%

2 ans de développement
Optimisation du protocole de production des librairies
Optimisation du pipeline d'analyses
Analyse en duplicats

2014 : le NGS est en routine sur échantillons tumoraux

NGS comparé aux techniques classiques de diagnostic (pyroséquencage + ARMS)

Sensibilité 77,4%
Spécificité 98,4%

CTRL : 584
FFPE: 3366

Seuil de détection 2%
Sensibilité 99,9%
Spécificité 99,9%

3 Faux positifs – 3 faux négatifs

Optimisation du protocole de séquençage
Optimisation du pipeline d'analyse
Analyse en duplicats

2014 : le NGS est en routine sur échantillons tumoraux

NGS comparé aux techniques classiques de diagnostic (pyroséquencage + ARMS)

Sensibilité 77,4%
Spécificité 98,4%

CTRL : 584
FFPE: 3366

Seuil de détection 2%
Sensibilité 99,9%
Spécificité 99,9%

2 ans de développement
Optimisation du protocole de production des librairies
Optimisation du pipeline d'analyses
Analyse en duplicats

Novembre 2014 : NGS en routine pour tous les marqueurs

Automatisation de la validation biologique / interface graphique

2015 : LE NGS est réalisé sur l'ADN tumoral circulant

NGS comparé aux techniques classiques de diagnostic (pyroséquencage + ARMS)

Sensibilité 77,4%
Spécificité 98,4%

CTRL : 584
FFPE: 3366

Seuil de détection 2%
Sensibilité 99,9%
Spécificité 99,9%

2 ans de développement
Optimisation du protocole de production des librairies
Optimisation du pipeline d'analyses
Analyse en duplicats

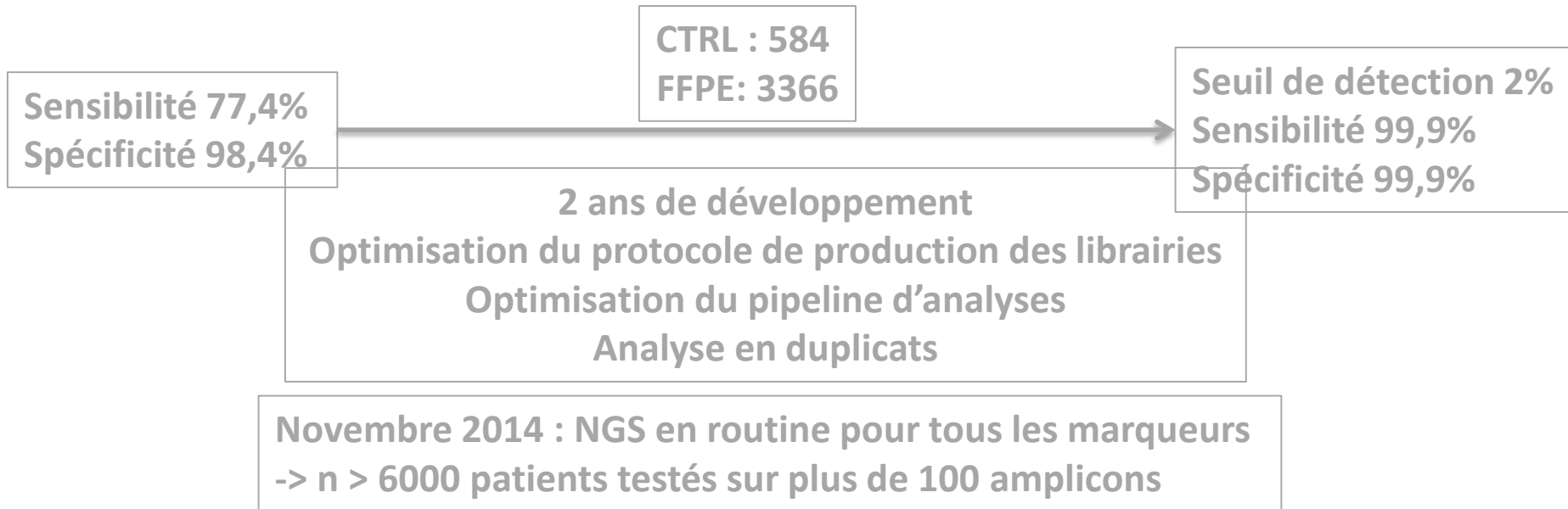
Novembre 2014 : NGS en routine pour tous les marqueurs
Automatisation de la validation biologique / interface graphique

NGS comparé échantillons FFPE vs plasma (n= 47)

Sensibilité 93%
Spécificité 100%
Concordance 90%

2015 : LE NGS est réalisé sur l'ADN tumoral circulant

NGS comparé aux techniques classiques de diagnostic (pyroséquencage + ARMS)



NGS comparé échantillons FFPE vs (17)

The pooled
sensitivity = 0.620 [95% CI, 0.513–0.716)
specificity = 0.959 (95% CI, 0.929–0.977)

Sensibilité 93%
Spécificité 100%
Concordance 90%

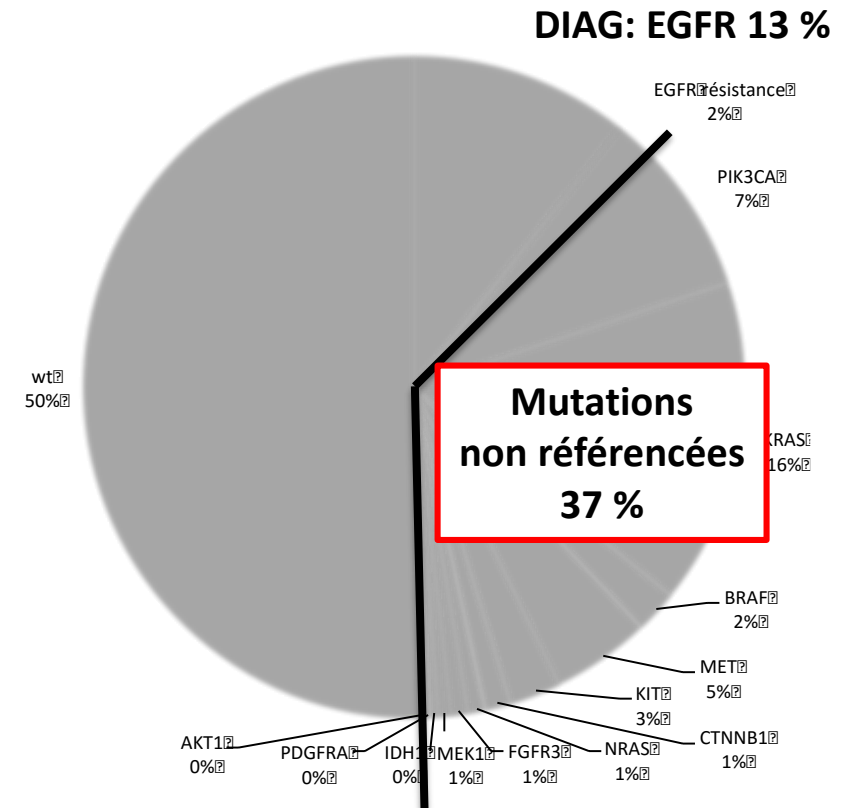
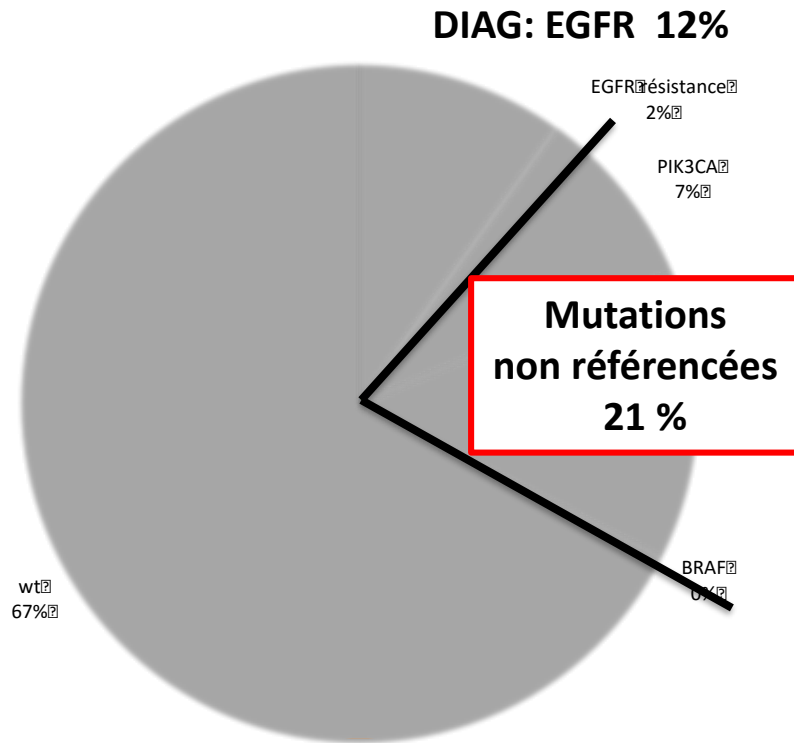
Janvier 2015 : NGS en routine sur ADN tc -> EGFRs & r / AMM modifié EGFR-TKI

FFPE : Stratification moléculaire améliorée au diagnostic

500 NSCLC

Procédure classique : 33% patients mutés

NGS-K20: 50% patients mutés



50% des patients présentent un mutation
-> mutation non référencée → RCP moléculaire → essais cliniques (?)
-> surrogate de la masse tumorale: suivi longitudinal des patients sur ADNtc

RCP moléculaire régionale mensuelle

Standard prescription [AMM, ATU, diagnostic]:
EGFR Lung, RAS Colon, BRAF Melanome, KIT/PDGFFA GIST, IDH Glioma

NGS –K20

Referred Mutation
No mutation

Unreferred
Mutation

Clinical data

Brittany
Molecular tumor
board

Non relevant
mutation

Relevant mutation
No trial

Relevant mutation
Trial open

Standard patient care

Regular
following

Enrolment at
progression

Clinical trial
Enrolment

Bilan 2015 - juillet 2016 : 211 patients (5%)

CPNPC, CCRm, Mélanome, GIST, gliome

Propositions : 67 patients (30%)

Essais cliniques 24 (10 AcSe)

Essais cliniques à progression 28 (12 AcSe)

Modifications stratégiques /std : 8 (db mutations, aspirine en adjuvant)

Enquête familiale : 3 (T790M)

ADNtc : 4 (suivi : hétérogénéité clonale – résistance possible)

Au Diagnostic : Panel NGS – Bilan 2015

62 patients CBNPC

9 EGFRs

5 EGFRs + T790M

5 KRAS+

2 BRAF+

1 PI3KCA+

« Négatif » pour EGFR (?)

23% EGFRs

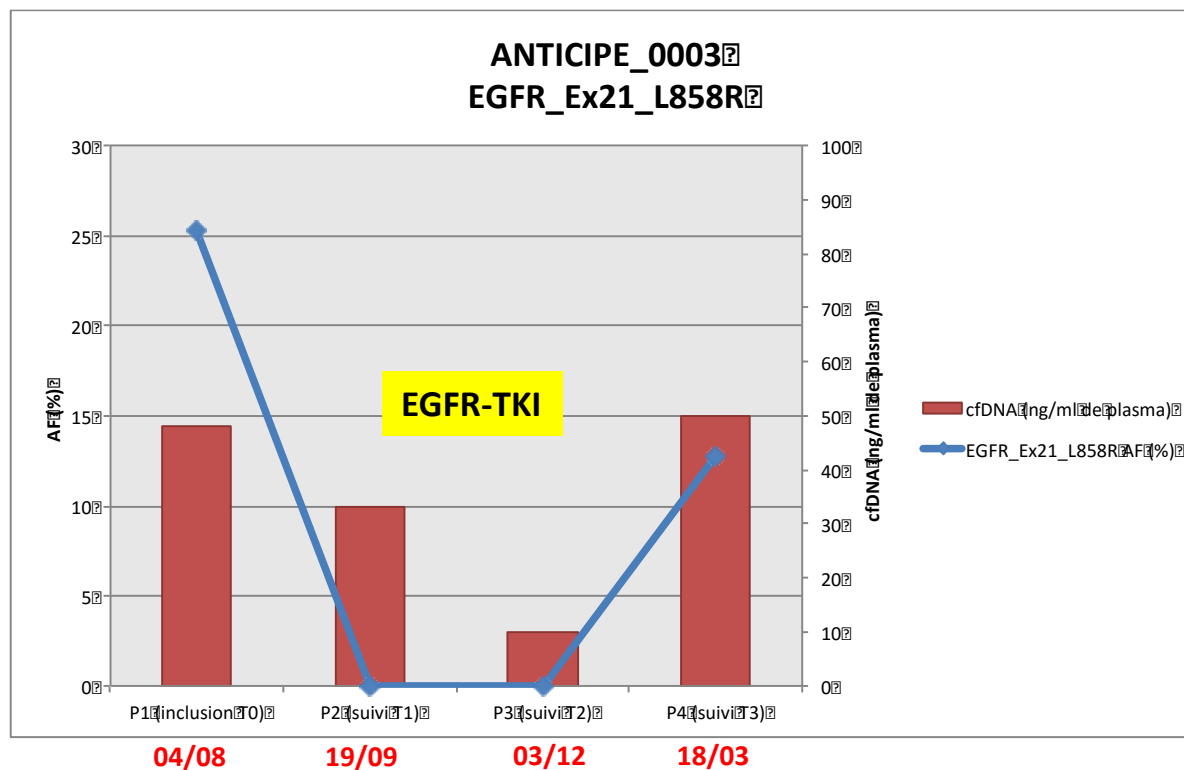
8% T790M

8% KRAS

-> biais de sélection des patients

-> démarche de diagnostic à la progression se met en place

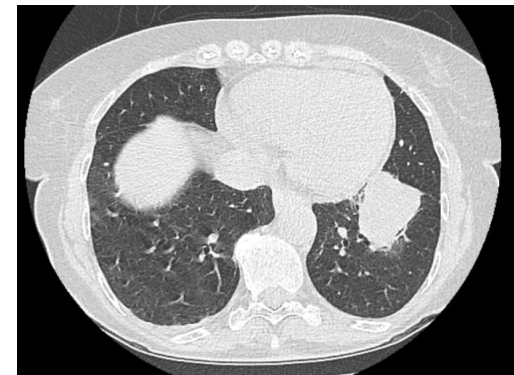
ADN circulant tumoral : Suivi avec le NGS-K20 – Ex1 CBNPC EGFR-TKI



11/07/14

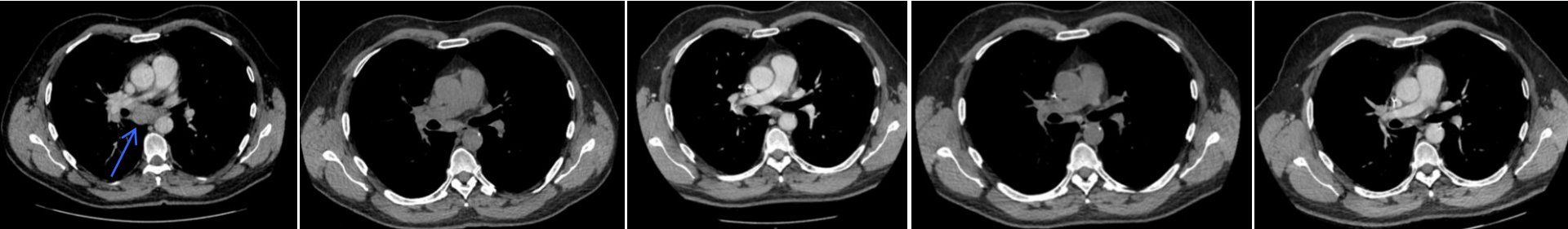
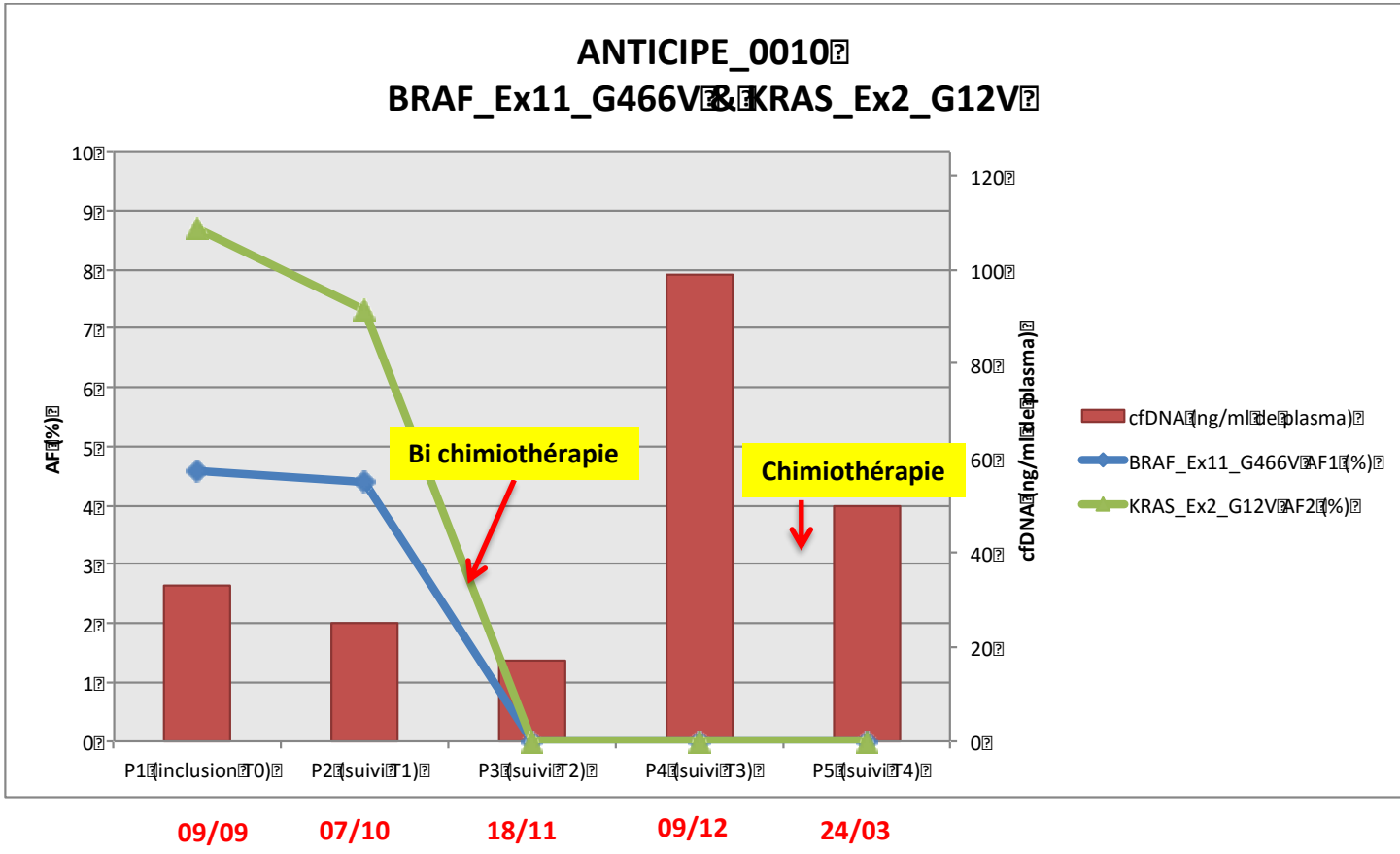


03/12/14



12/03/15

ADN circulant tumoral : Suivi avec le NGS-K20 – Ex2 CBNPC ChimioT



03/10/14

14/11/14

26/12/14

03/02/15

10/04/15

Intérêt médico-économique du panel dédié : **indicateurs ?**

Nombre d'**inclusions** en essais cliniques :

→ réseau national des RCPm (mutations souvent rares)

Paramètres de réponse et de survie :

→ sur quelle cohorte de patients

Drugabilité des variants non référencés (souvent rare)

→ inférence bioinformatique : Compatible au délais du diagnostic

Paramètres économiques

→ panier commun : LI RIHN recommandations

Evolution des panels :

Augmenter la **précision** :

→ Panel V6 : diagnostic et suivi (32 gènes – 150 amplicons) / 2016

Résistance EGFR-, ALK-, BRAF-TKI

Diagnostic : OMS 2016 gliomes (IDH, TRETp, Histones)

Détecter également les **mutations complexes**

→ combiner DNA et RNA seq

Quelle **sensibilité** nécessaire : ?

part de la méthode

de l'étape préanalytique

de la localisation tumorale

du type de fluide biologique

Pour quelles thérapies (ciblées ou non ciblées) : ?

M de sensibilité, de résistance, surrogate de masse T

Alternative thérapeutique possible?

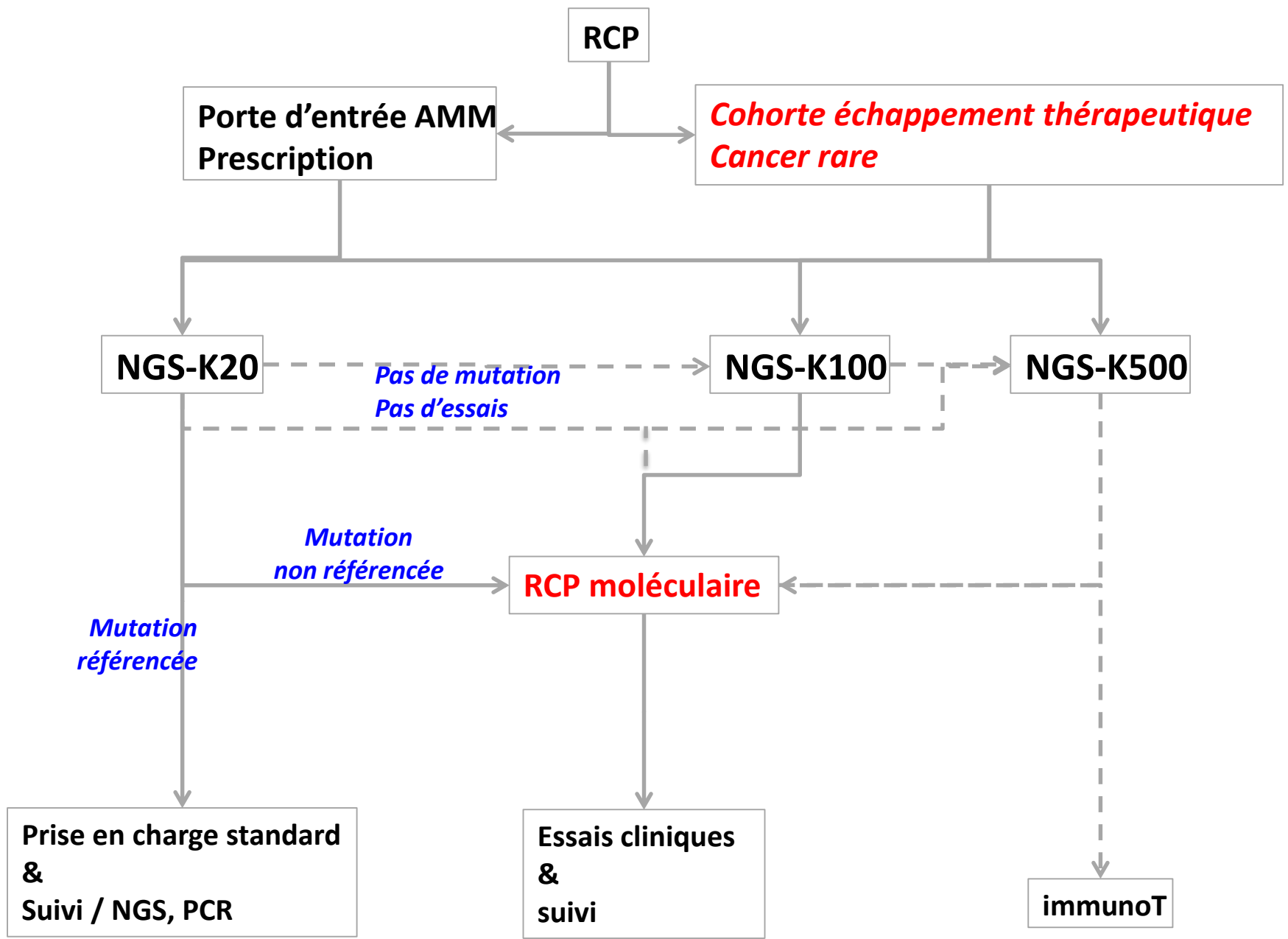
TKI de 1^e, 2^e, 3^e génération (NSCLC)

Immunothérapie,

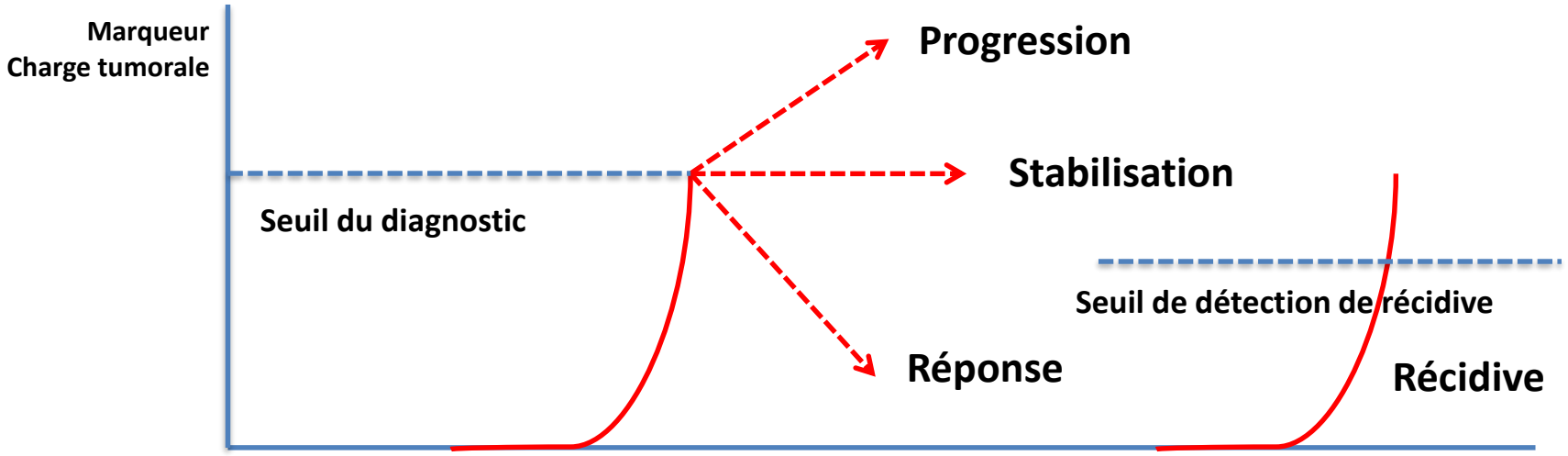
chimiothérapie

→ **NGS : Dynamique de la clonalité tumorale au cours du traitement**

Perspectives (3) : RIHN : 3 LI pour NGS-K20, -K100, -K500



Conclusion : Place du NGS dans le diagnostic et le suivi moléculaire des patients



RISQUE
Gènes de prédisposition

DIAGNOSTIC
Stratégie thérapeutique
Pronostic
Identifier surrogat

SUIVI
-> Réponse
-> Récidive
-> Résistance

*BRCA, MMR...
EGFR T790M?*

*EGFRs, RAS, BRAF
MET, ALK,
IDH, TERTp...*

*EGFRr
ALKr, ROSr
RAC1, MAPK...
Surrogates*

MERCI



Plate-forme Génomique environnementale & humaine

UR1, CHU, Biogenouest, IBiSA
Amandine Etcheverry
Marc Aubry



Service de Génétique Moléculaire et Génomique - *Plate-forme INCa*

Alexandra Lespagnol
Marie de Tayrac
Annick Mosser
Marie-Dominique Galibert
Jean Mosser

Direction des systèmes d'information

CHU de Rennes
Christine Pichon
Denis Courtel
Arnauld Coursin

RCP Moléculaire bretonne (Julien Edeline & Jean Mosser)

génétiens
dermatologues
gastro-entérologues
gynécologues
pathologistes
pneumologues
neuro-oncologues
neuro-pédiatres...

PF INCa Brest & Rennes

Pole régional de cancérologie

Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques

Nathalie Rioux-Leclercq



Observatoire
des Sciences de l'Univers
de Rennes

Terre, Écosystèmes et Sociétés

