

La RCP moléculaire

Le NGS en pratique clinique

Symposium de la SFP

JC Sabourin





Tumor Hotspot
MASTR Plus

26 gènes, sélection « INCa »



multiplex amplification of 252 amplicons (121-254 bp) in 4 PCR reactions

AKT, **ALK**, **BRAF**, CDKN2A, CTNNB1, DDR2,
EGFR, **ERBB2**, ERBB4, FGFR2, FGFR3,
H3F3A, HIST1H3B, HRAS, **IDH1**, **IDH2**, **KIT**,
KRAS, MEK1, **MET**, **NRAS**, **PDGFRA**,
PIK3CA, PIK3KR1, PTEN, STK11

Test de routine pour ADK poumon et colorectaux,
GIST, mélanomes, tumeurs cérébrales

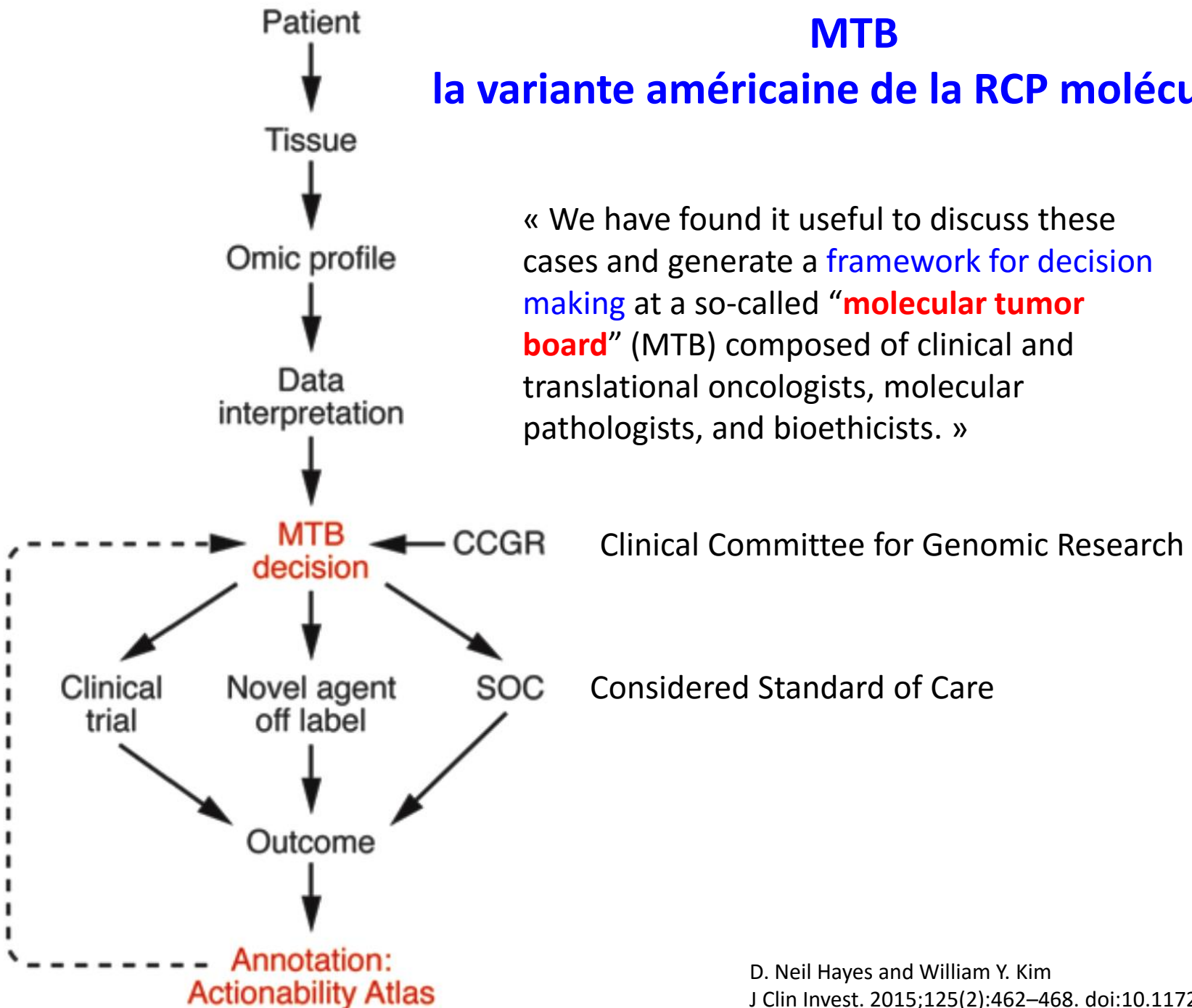
ADK du poumon

Gene	Exon	g.	NM	Variation détectée	Balance Allélique	Ref Count	Alt Count	Profondeur	Effet protéique	Interprétation	Commentaire
ALK	29	29416366	NM_004304.4	c.4587C>G	100%	0	3974	7948	p.Asp1529Glu	Pol validé	
ALK	29	29416572	NM_004304.4	c.4381A>G	99,92%	10	12632	25285	p.Ile1461Val	Pol validé	
ALK	29	29416723	NM_004304.4	c.4230del	2,42%	3181	79	6452	p.Val1411Cysfs*3	Artefact	
CDKN2A	2	21970928	NM_000077.4	c.430C>T	12,94%	7503	1115	17120	p.Arg144Cys	Artefact	
CDKN2A	2	21971137	NM_000077.4	c.221A>C	6,55%	3212	225	10779	p.Asp74Ala	Artefact	
CDKN2A	2	21971164	NM_000077.4	c.194T>C	3,19%	2370	78	10204	p.Leu65Pro	Artefact	
CDKN2A	1	21974747	NM_000077.4	c.80A>G	3,07%	8948	283	18717	p.Glu27Gly	Artefact	
DDR2	14	162741838	NM_001014796.1	c.1529T>C	28,28%	4042	1594	11279	p.Val510Ala	Artefact	
ERBB2	21	37881448	NM_004448.3	c.2640T>A	2%	5245	107	10728	p.Asp880Glu	Artefact	
HRAS	2	534295	NM_005343.2	c.26_28del	2,11%	9717	209	19685	p.Val9del	Artefact	
KIT	11	55593584	NM_000222.2	c.1650del	3,24%	3400	114	6912	p.Lys550Asnfs*14	Artefact	
KIT	18	55602684	NM_000222.2	c.2505del	3,06%	3298	104	6705	p.Trp835*	Artefact	
KRAS	2	25398284	NM_033360.2	c.35G>T	36,07%	1060	598	3319	p.Gly12Val	Délétère	
MET	2	116339450	NM_001127500.1	c.312del	2,58%	3284	87	6662	p.Ala105Profs*16	Artefact	
MET	2	116339569	NM_001127500.1	c.431A>G	9,89%	4117	452	9121	p.His144Arg	Artefact	
MET	2	116340177	NM_001127500.1	c.1039G>A	16,36%	2837	555	6777	p.Ala347Thr	Artefact	
MET	14	116411954	NM_001127500.1	c.2993del	2,08%	6977	148	14141	p.Leu998Trpfs*5	Artefact	
PIK3CA	21	178952120	NM_006218.2	c.3175T>C	4,3%	4544	204	9486	p.Phe1059Leu	Artefact	
PTEN	7	89717775	NM_000314.4	c.800del	2,42%	1534	38	3116	p.Lys267Argfs*9	Artefact	
STK11	6	1221292	NM_000455.4	c.815A>G	8,02%	7654	667	16613	p.Tyr272Cys	Artefact	
STK11	8	1223171	NM_000455.4	c.1108G>A	2,91%	1637	49	3372	p.Gly370Arg	VSI	

MTB

la variante américaine de la RCP moléculaire

« We have found it useful to discuss these cases and generate a **framework for decision making** at a so-called “**molecular tumor board**” (MTB) composed of clinical and translational oncologists, molecular pathologists, and bioethicists. »



Données NGS : besoin d'une aide à la prise en charge

Classification UNCseq

(University of North Carolina at Chapel Hill [UNC] next-gen sequencing platform)

Classe 5 : variant actionnable (avec effet théranostique)

- variant avec AMM dans cette pathologie
- variant avec AMM dans une autre pathologie
- variant pour lequel il existe des thérapies ciblées en essais cliniques
- variant pour lequel il existe des données précliniques
- variant à signification pronostique

Classe 4 : variant sans effet théranostique connu mais avec un effet potentiel activateur (oncogène) ou délétère (gène suppresseur)

Classe 3 : variant sans effet connu dans la littérature. Des données de modélisation peuvent orienter vers un effet de la mutation

Classe 2 : variant potentiellement neutre

Classe 1 : variant connu comme un polymorphisme constitutionnel

MODÈLE DE COMPTE RENDU DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE POUR LA RECHERCHE DE MUTATIONS SOMATIQUES DANS LES TUMEURS SOLIDES

Septembre 2016

IDENTIFICATION DU LABORATOIRE

Titre de l'examen

EXAMEN N° : [code ou identifiant unique de l'échantillon par le laboratoire de génétique somatique]

- Patient : Nom Prénom Nom de naissance
Né(e) le Sexe : F/H
- Réalisé à partir du prélèvement référencé [n° identification du bloc dans le laboratoire pathologie d'origine] datant du [date du prélèvement]
- Reçu le [date d'arrivée du prélèvement sur la plateforme]
- Prescrit par : [nom, prénom et coordonnées du prescripteur] le [date de la prescription]
- Motif de l'analyse demandée : [préciser ici le contexte clinique de la demande]

RENSEIGNEMENTS ANATOMO-CYTO-PATHOLOGIQUES :

- Type de prélèvement [pièce opératoire, biopsie, cytologie...] et organe :
- Type histologique et état tumoral (primitif, métastase et origine) :
- Pathologiste responsable du diagnostic : [nom, prénom et coordonnées du pathologiste responsable du diagnostic initial]
- Type de matériel tumoral : [FFPE, matériel congelé] et type de prélèvement [fragment, ponction, ctDNA...]
- Analyse réalisée sur une zone sélectionnée par le Dr [pathologiste de la plateforme] comportant [x] % de cellules tumorales.

CONCLUSION / INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS EN L'ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES :

- Dans la limite des techniques utilisées, aucune mutation n'a été détectée dans le(s) exon(s) X du gène X.
Commentaire éventuel pour un patient ayant un cancer colorectal et sans mutation de KRAS : Il n'est pas détecté de mutations de résistance aux traitements par des anticorps anti-EGFR.
- Présence de la mutation [nom usuel, par exemple L858R] du gène X conférant une sensibilité à [nom de la classe de thérapie ciblée].
- Présence de la mutation [nom usuel] du gène X conférant une résistance à [nom de la classe de thérapie ciblée].
- Présence d'une mutation du gène X de valeur prédictive indéterminée de réponse à [nom de la classe de thérapie ciblée].
- Dans la limite des techniques utilisées, aucune mutation n'a été détectée dans le(s) exon(s) X du gène X. Étant donné le faible % (< X %) de cellules tumorales présentes dans l'échantillon analysé, ce résultat est non contributif : il est donc recommandé d'effectuer un contrôle sur un prélèvement plus riche en cellules tumorales.
- Étant donnée la qualité et/ou [au choix] quantité de l'ADN extrait du prélèvement transmis, l'analyse n'est pas réalisable et/ou [au choix] interprétable. Un nouveau prélèvement serait nécessaire.
- Analyse non réalisable car [tissu nécrosé, bloc épuisé].
- Présence d'une mutation du gène [altération de classe 4 ou 5, nom usuel] à discuter en RCP moléculaire. [possibilité d'ajouter des précisions sur l'existence d'essais cliniques sur ce gène, notamment pour le programme AcSé]
- Détection d'un gain/perte de copies du gène [altération de classe 4 ou 5, nom usuel] suggérant l'existence d'une amplification/délétion du gène. Ce résultat doit impérativement être vérifié par une technique complémentaire validée. L'intérêt clinique de cette altération est à discuter en RCP moléculaire.

MÉTHODE

- Analyse réalisée à partir d'un prélèvement (bloc / nombre de lames blanches / copeaux / tissu congelé) fixé au [si information disponible], après macrodissection [ou selon autre méthode] de la zone d'intérêt.
- Méthode d'extraction de l'ADN génomique tumoral [si un kit commercial est utilisé : nom et version]
- Méthode d'analyse [si un kit commercial est utilisé : nom et version], séquenceur utilisé, sensibilité, profondeur minimale, liste des gènes et des exons analysés, version du génome de référence utilisé, niveau de couverture des exons et séquence de référence [accession number]
- Version du pipeline d'analyse

- **Variants dont l'impact clinique est connu** classe 5, avec AMM dans la pathologie, à décrire selon la nomenclature HGVS

Gène	Séquence de référence	Variant	Altération protéique
Ex : EGFR	NM_005228.3	c.2573T>G	p.Leu858Arg

- **Variants à discuter en RCP moléculaire** classes 4 et 5 sans AMM dans la pathologie, à décrire selon la nomenclature HGVS

Gène	Séquence de référence	Variant	Altération protéique
Ex : MET	NM_001127500.1	c.2942-2A>G	variant d'épissage

- **Autres variants dont la valeur prédictive est inconnue** classe 3, à décrire selon la nomenclature HGVS

Gène	Séquence de référence	Variant	Altération protéique
	Variant de Signification Inconnue VSI		

- Gènes pour lesquels aucune anomalie n'a été retrouvée les lister, selon la nomenclature HGVS
- Résultat non interprétable pour les gènes les lister, en raison d'une profondeur de séquençage insuffisante
- Résultat non interprétable [préciser la raison]
- Analyse non réalisable [préciser la raison]

Fait à [lieu]

le [date du compte rendu]

Signature

Recherche d'anomalies moléculaires par séquençage haut débit.

- Réalisé à partir du prélèvement référencé : BH16.16359

RESULTATS :

- Détection d'un variant présentant un impact théranostique dans l'état actuel des connaissances :

Gène	Exon	Séquence de référence	Variation nucléotidique	Altération protéique	Ratio allélique
<i>KRAS</i>	2	NM_033360.2	c.35G>T	p.(Gly12Val)	36,07%

Ce résultat a été vérifié par un SNaPshot® indépendant.

- Détection d'un variant à discuter en RCP moléculaire :

Gène	Exon	Séquence de référence	Variation nucléotidique	Altération protéique	Ratio allélique
<i>STK11</i>	8	NM_000455.4	c.1108G>A	p.(Gly370Arg)	2,91%

Cette variation n'a jamais été rapportée à notre connaissance.

- Dans la limite de la technique utilisée, aucune mutation n'a été détectée sur les autres régions analysées.

INTERPRETATION DANS L'ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES :

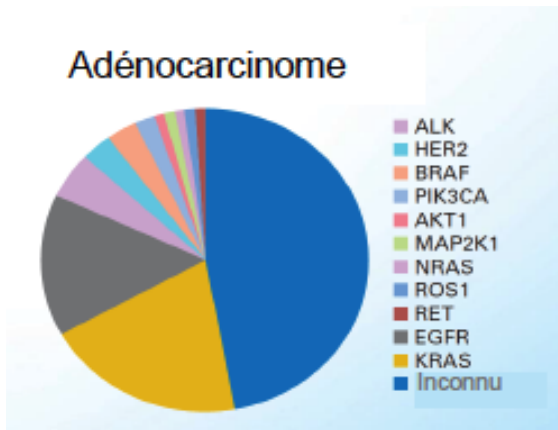
- Présence d'une mutation du gène *KRAS* prédictive de la résistance aux traitements par les anticorps anti-EGFR.
- Dans la limite des techniques utilisées, aucune mutation n'a été détectée au niveau des gènes *AKT1*, *ALK*, ***BRAF***, *CDKN2A*, *CTNNB1*, *DDR2*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *FGFR2*, *FGFR3*, *H3F3A*, *HIST1H3B*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *KIT*, *MAP2K1*, ***MET***, ***NRAS***, *PDGFRA*, ***PIK3CA***, *PIK3KR1*, *PTEN*.
- Détection d'un variant de signification inconnue au niveau du gène *STK11*.

Pourquoi une RCP moléculaire ?

CBNPC métastatique : **recommandations** de traitements par thérapie ciblée :

- . Mutation EGFR « de sensibilité » : Afatinib, Gefitinib et Erlotinib, dès la 1^{ère} ligne
- . Réarrangement ALK et ROS1 : Crizotinib, Ceritinib en cas de résistance

Des questions « même » pour EGFR : quelles mutations considérer ?



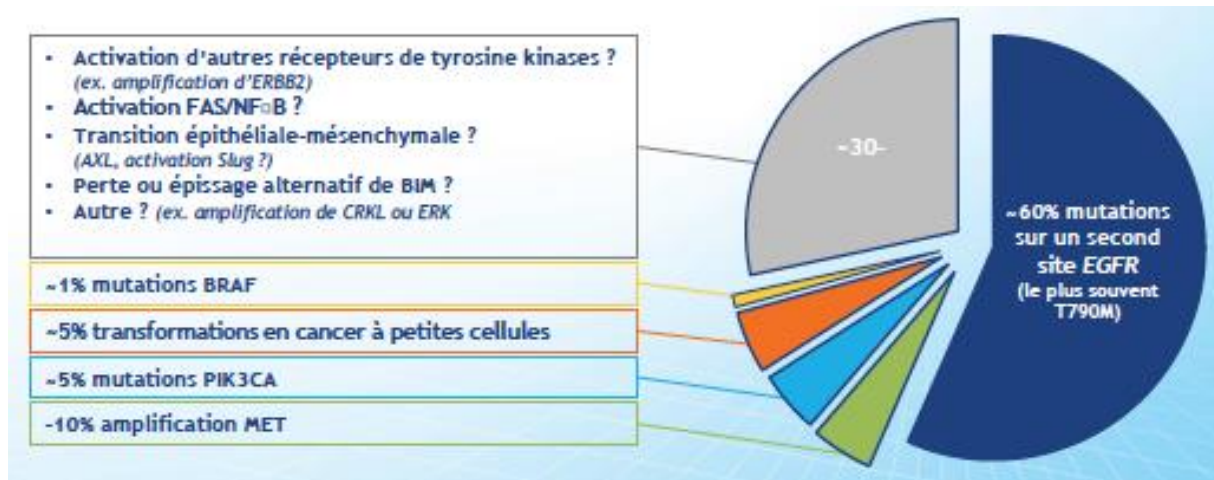
	Exon 18	Exon 19	Exon 20	Exon 21
Classique		Del E756-T750 746/752 749/759		L858R
Rare	G719X	Insertion VAIKEL	T790M S768I	L861Q
Exceptionnelle	E709X	D761Y L747S	Insertions V769X N771T	G863D N826S A839T T854A
	Mutations complexes			

Adapté d'après

J. Mazières, Journée de Médecine Translationnelle IFCT 2014
 Ohashi, JCO 2013
 Yang et al. Lancet Oncol 2015

Pourquoi une RCP moléculaire ?

- Rechercher (et interpréter) les mécanismes de **résistance secondaire**



Pourquoi une RCP moléculaire ?

- Connaître les **moyens d'accéder aux molécules innovantes**

Cible	Prévalence (%)	Agents thérapeutiques	
		Disponible AMM	Essais cliniques / ATU / Disponible autre indication
EGFR	Asiatiques ~40 Caucasiens ~10	✓	
ALK	< 5	✓	
HER2	< 3		×
PIK3CA	< 5		×
BRAF	< 5		×
MEK	~ 1		×
ROS1	~ 2		×
RET	~ 2		×
MET	1 - 11		×
FGFR1	~ 3		×
PTEN	< 10		×






Essai de Phase II

AcSé crizotinib

Accès sécurisé au crizotinib pour les patients souffrant d'une tumeur porteuse d'une altération génomique sur une des cibles biologiques de la molécule.

Sponsor N° : UC-0105/1303
EudraCT N° : 2013-000885-13

Médecin coordonnateur :
Pr Gilles VASSAL – Gustave Roussy - Villejuif

Statisticien :
Dr Marie-Cécile LE DELEY – Gustave Roussy - Villejuif

AcSé crizotinib - Point mensuel - 20 mars 2014

Pourquoi une RCP « moléculaire » ?

- identifier les **mutations d'intérêt**
- connaître les **thérapies innovantes** disponibles et les moyens d'**accès**
- **partager les expériences et lectures** sur des traitements d'utilisation non courante
- adopter des **stratégies spécifiques** lors de la progression :
 - . rechercher des mécanismes de résistance secondaire « actionnables »
 - . retarder la décision de changement de ligne
 - . traitements combinés et poursuite d'un TKI ayant été efficace

L'Expérience Normande



Exemple Normand : fonctionnement depuis 2 ans

- visioconférence le premier lundi de chaque mois à 17h30
- discussion sur
 - . nouveaux patients avec une altération génétique rare (liste établie par la plateforme de génétique en Normandie orientale)
 - . tout patient sur demande du médecin référent
 - . actualités dans le domaine des thérapies ciblées (nouveaux essais,...)
avec conséquence pratique à court terme
- fiche de RCP dédiée
 - . pré-remplie par la plateforme dans le cas des nouveaux patients
 - . envoyée avant la réunion (idéalement)

La fiche RCP moléculaire normande

RCP moléculaire normande d'oncologie thoracique

Présents

Patient

NOM _____ PRENOM _____

Né le _____ Centre _____

Référents

Pneumologue _____ Pathologiste _____

Antécédents majeurs (autre cancer, immunodépression, insuffisance d'organe, ...)

Diagnostic

Histologie _____ TNM _____

Type de prélèvement _____ Date _____

Génétique

Gène 1 _____ Anomalie 1 _____

Technique 1 _____ Commentaire _____

% cellules tumorales _____ Surface analysée _____

Gène 2 _____ Anomalie 2 _____

Technique 2 _____ Commentaire _____

% cellules tumorales _____ Surface analysée _____

Anamnèse résumée

RCP moléculaire normande d'oncologie thoracique

Présents

Patient

NOM _____ PRENOM _____

Né le _____ Centre _____

Référents

Pneumologue _____ Pathologiste _____

Antécédents majeurs (autre cancer, immunodépression, insuffisance d'organe, ...)

Diagnostic

Histologie _____ TNM _____

Type de prélèvement _____ Date _____

Génétique

Gène 1 _____ Anomalie 1 _____

Technique 1 _____ Commentaire _____

% cellules tumorales _____ Surface analysée _____

Gène 2 _____ Anomalie 2 _____

Technique 2 _____ Commentaire _____

% cellules tumorales _____ Surface analysée _____

Anamnèse résumée

Point d'étape en Normandie

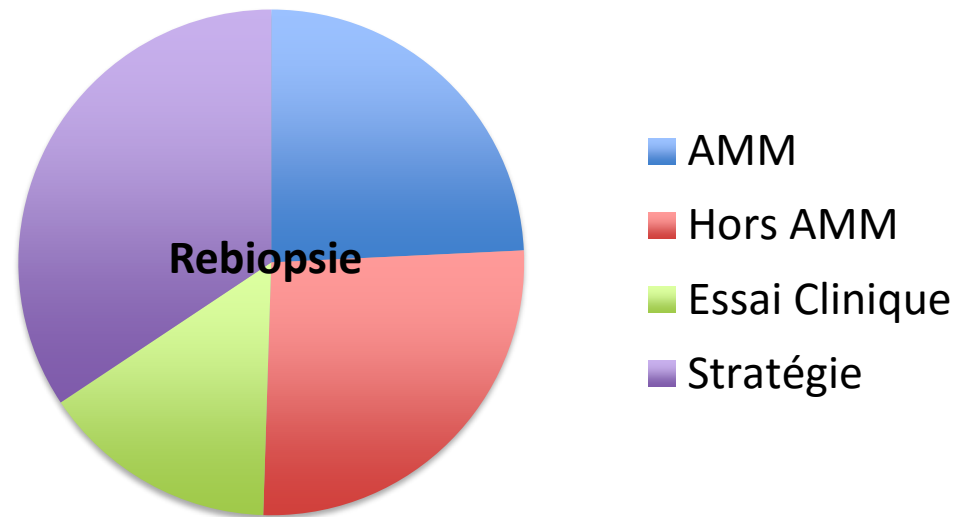
- 180 patients uniques présentés

- . 50 nouveaux patients, 109 patients en progression (après 1 à 6 lignes)
- . Moyenne d'âge : 64 ans
- . Délai médian depuis le diagnostic : 17 mois (0 ; 91)

- Centres participants :

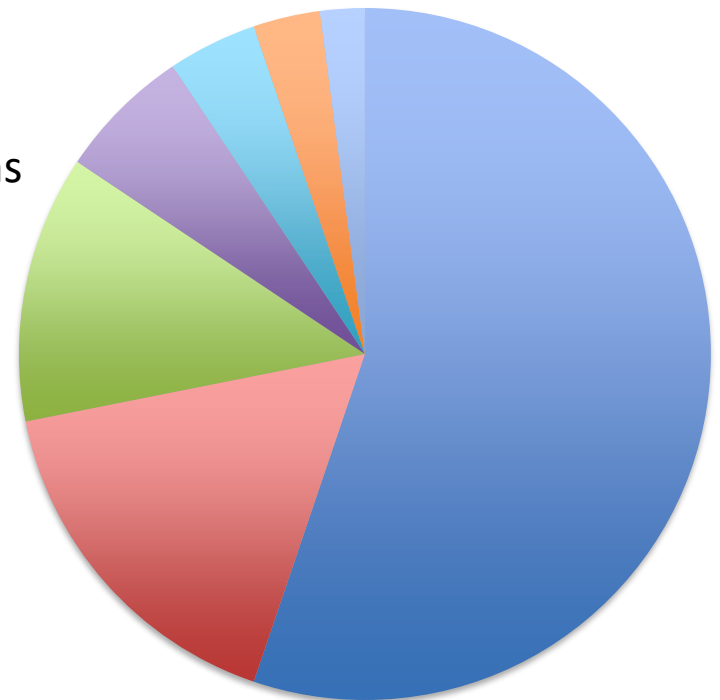
- . CHU : Rouen
- . CLCC : Baclesse (Caen), Becquerel (Rouen)
- . CHG : Le Havre, Elbeuf, Dieppe, Avranches, Evreux
- . Cliniques privées : Saint-Hilaire (Rouen), Mégival (Dieppe)

- Types de propositions :



Point d'étape en Normandie

- . EGFR (84) :
 - au diagnostic, pour les mutations rares
 - en situation de résistance secondaire (rebiopsie, ttt local, TKI3G)
- . ALK (29)
 - au diagnostic, pour Crizotinib en première ligne (PROFILE 1014)
 - en situation de résistance secondaire (rebiopsie, ttt local, TKI2G)
- . MET (12) : Crizotinib ?
- . HER2 (10) : Trastuzumab, Lapatinib, ...
- . BRAF (7) : Vémurafenib, Dabrafenib, combinaisons
- . ROS1 (4) : Crizotinib
- . RET (5) : Cabozantinib, Vandetanib, Sunitinib



■ EGFR ■ ALK ■ MET ■ HER2 ■ BRAF ■ ROS1 ■ RET

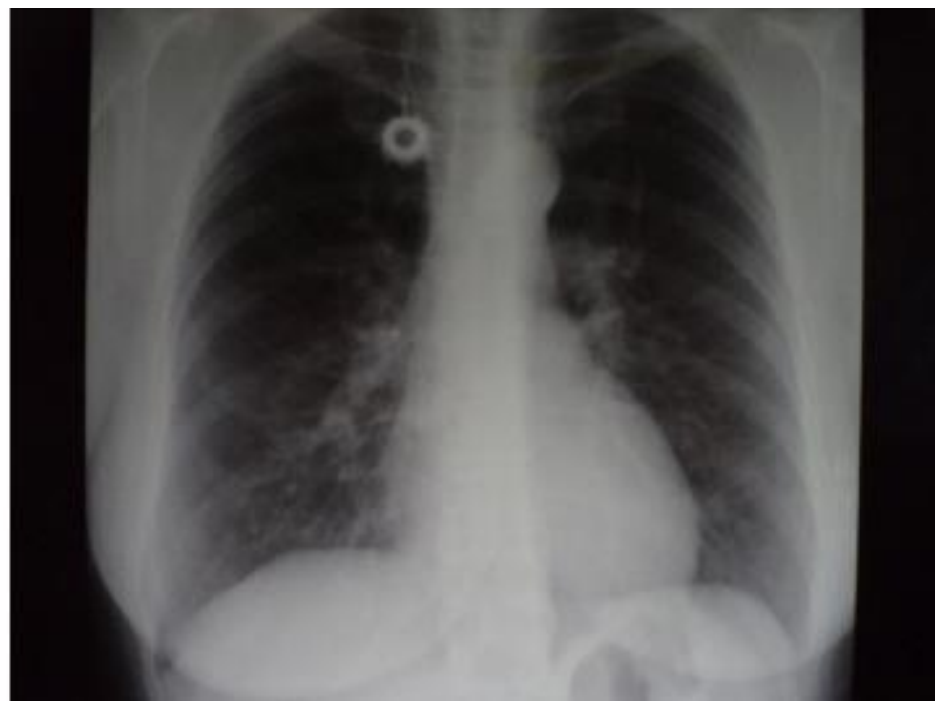
Traitements actifs sur des anomalies moléculaires rares

Patiente 58 ans, non fumeur, ADK pulmonaire

ADK **muté HER2** : proposition de traitement par trastuzumab Herceptin®



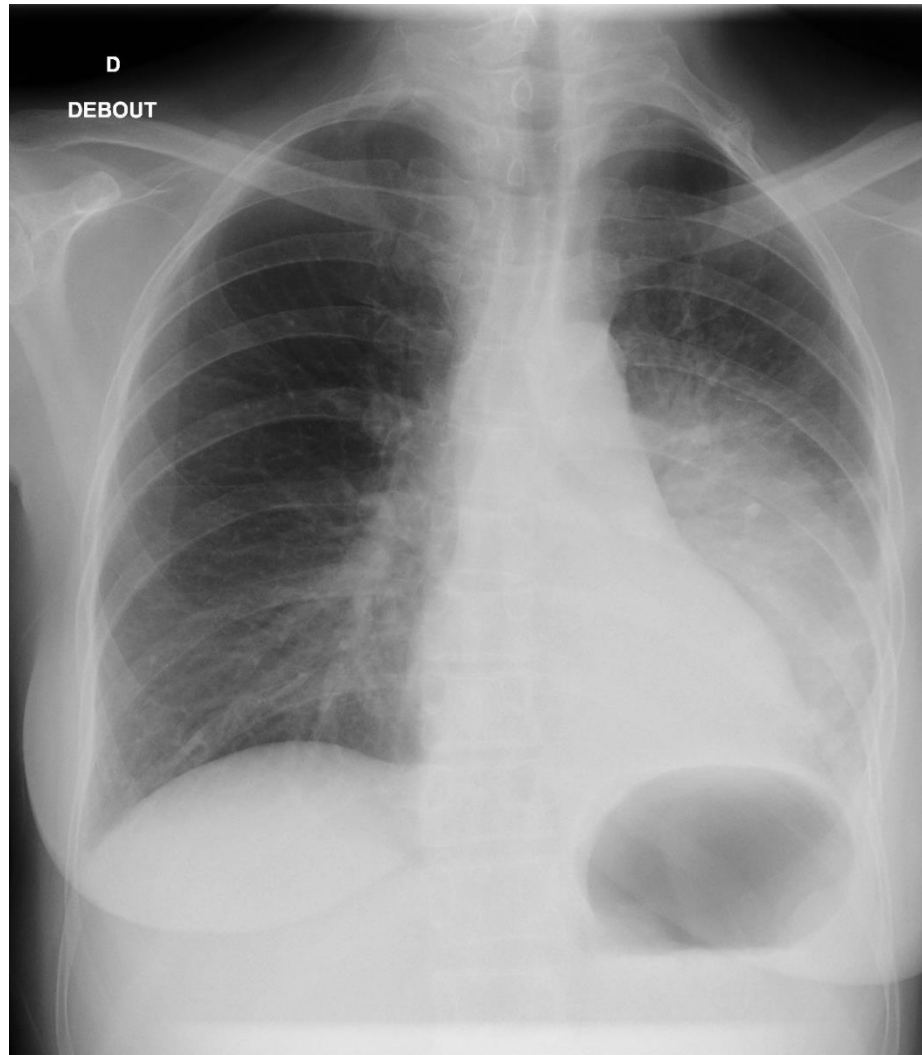
Avant TTT



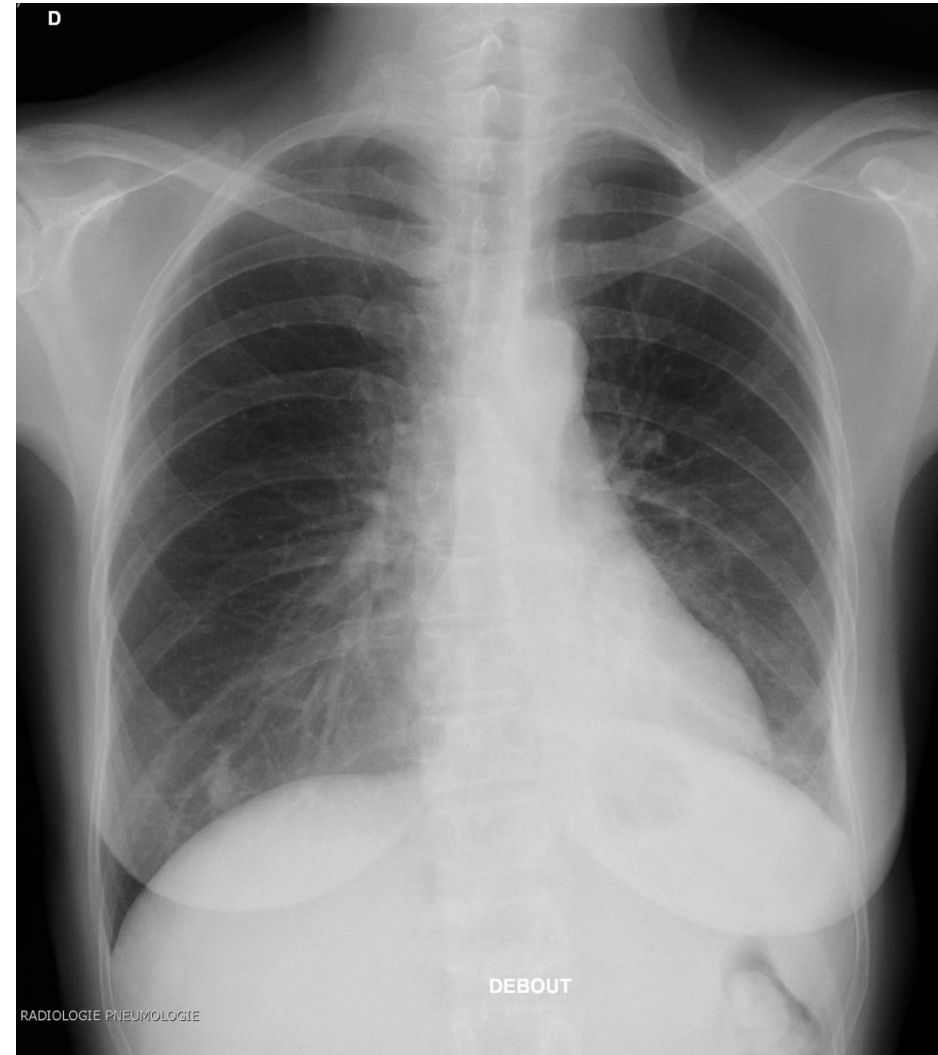
Après TTT

Exemple d'un patient de 66 ans avec ADK pulmonaire

Mutation V600E : proposition de traitement par vemurafenib Zelboraf®



DECEMBRE 2012



MARS 2013

La RCP Moléculaire

Attitudes « consensuelles » :

- accélérer l'acquisition d'une expérience collective
 - . **ADNtc et rebiopsie** à progression sous TKI-EGFR
 - . HER2 : Paclitaxel-Trastuzumab hebdomadaire
 - . EGFR mutations rares : Afatinib
 - ...

- 'justifier' nos prises en charge auprès des tutelles
 - . Crizotinib en première ligne chez le patient fragile / inéligible à la chimiothérapie (avant modification AMM ALK et ROS)
 - . TKI-EGFR chez un patient avec mutation EGFR sur ADNtc et sans histologie
 - ...

Se donner les moyens de rendre réel

le « meilleur » pronostic du cancer avec driver oncogénique !

Merci pour votre attention !

RCP moléculaire Normande

**MERCI À FLORIAN GUISIER
ET À TOUS LES PARTICIPANTS DE NOTRE RCP MOL!**