Carrefour Pathologie 2018

5 au 8 novembre
Palais des Congrès Paris

Séance Flash SFP

Les biomarqueurs dans les cancers du poumon non à petites cellules : situation en 2018 et perspectives

Les mutations d'EGFR et leur détection sur tissu et ADNtc

Dr I Rouquette
Anatomie Pathologique
Plateforme d'analyse moléculaire des tumeurs solides
CHU Toulouse IUCT Oncopôle

Hôpitaux de Toulouse

INSTITUT UNIVERSITAIRE DU CANCER DE TOULOUSE
Oncopole

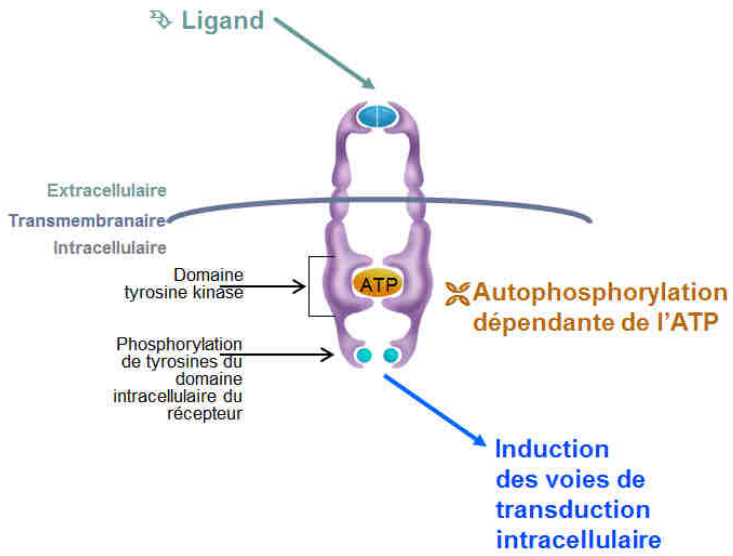
Question 1 : Quelle(s) est (sont) la(es) proposition(s) exacte(s) concernant la recherche de mutations EGFR

- A- La sensibilité de détection de la mutation T790M est supérieure sur l'ADNtc
- B- La technique la mieux adaptée à la recherche des mutations d'EGFR dans le sang circulant est le séquençage Sanger
- C- La recherche des mutations EGFR est pratiquée en routine par les plateformes françaises
- D- le NGS ne permet pas une recherche exhaustive des mutations d'EGFR
- E- La ddPCR permet une quantification précise du nombre de copies mutées

Question 1 : Quelles est (sont) la(es) proposition(s) exacte(s) concernant la recherche de mutations EGFR

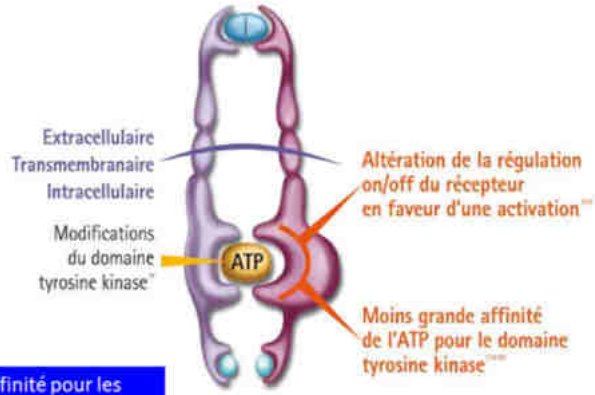
- A- La sensibilité de détection de la mutation T790M est supérieure sur l'ADNtc
- B- La technique la mieux adaptée à la recherche des mutations d'EGFR dans le sang circulant est le séquençage Sanger
- C- La recherche des mutations EGFR est pratiquée en routine par les plateformes françaises
- D- le NGS ne permet pas une recherche exhaustive des mutations d'EGFR
- E. La ddPCR permet une quantification précise du nombre de copies mutées

EGFR : le récepteur



EGFR les mutations activatrices

➢ Une mutation à l'origine de changements conformationnels et fonctionnels du récepteur

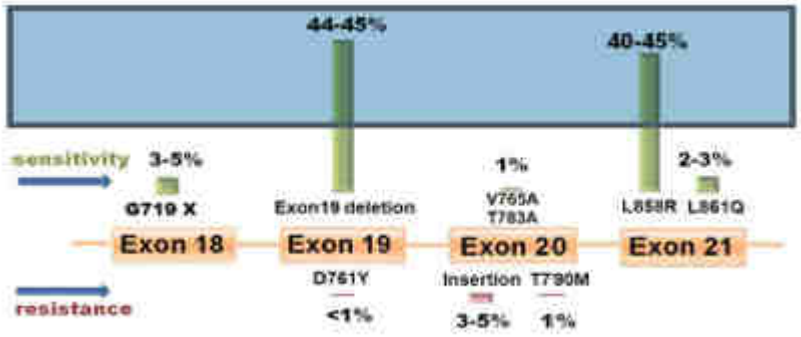


Plus grande affinité pour les inhibiteurs de tyrosine kinase compétiteurs de l'ATP

90%

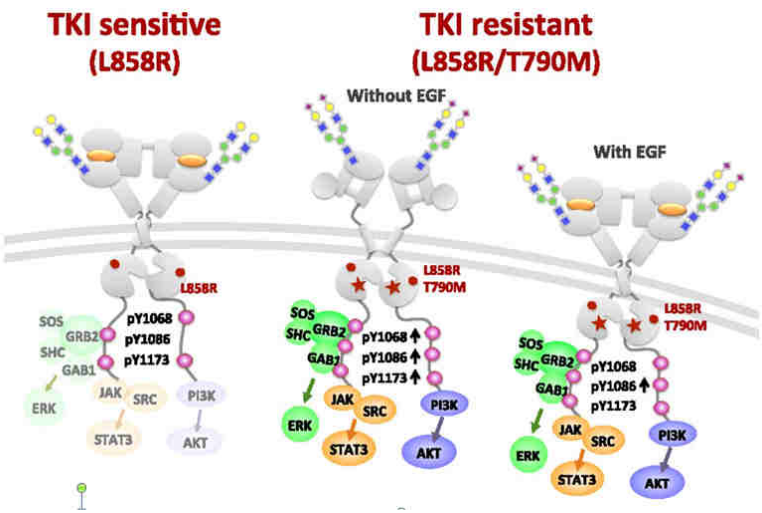
- ➢ del EX 19
- ➢ L858R EX 21

Activation constitutive



EGFR la mutation de résistance T790M

T790M point mutation increases receptor affinity for ATP binding with a consequent drastic reduction in drug activity



Mutations activatrices: Pourquoi les détecter?

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812 MAY 20, 2004 VOL. 350 NO. 21

Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib

Thomas J. Lynch, M.D., Daphne W. Bell, Ph.D., Raffaella Sordella, Ph.D., Sarada Gurubhagavatula, M.D., Ross A. Okimoto, B.S., Brian W. Brannigan, B.A., Patricia L. Harris, M.S., Sara M. Haserlat, B.A., Jeffrey G. Supko, Ph.D., Frank G. Haluska, M.D., Ph.D., David N. Louis, M.D., David C. Christiani, M.D., Jeff Settleman, Ph.D., and Daniel A. Haber, M.D., Ph.D.

ITK première et deuxième génération

Erlotinib
Gefitinib
Afatinib

AMM première ligne

Dacomitinib

FDA and EMA Accept Regulatory Submissions for Dacomitinib in Metastatic NSCLC With *EGFR*-Activating Mutations

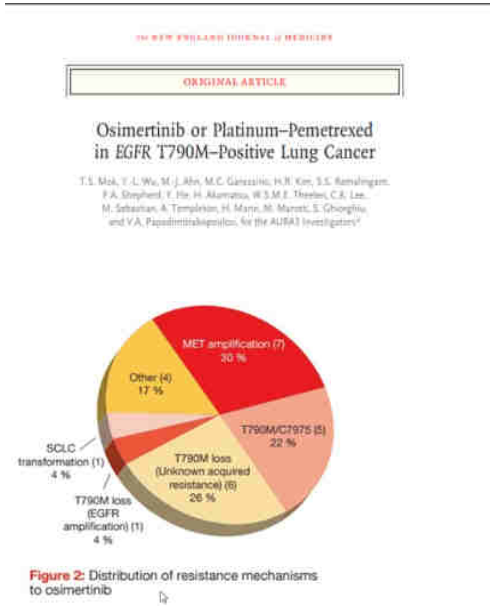
By The ASCO Post
Posted: 4/9/2018 11:05:19 AM

Troisième génération

Osimertinib

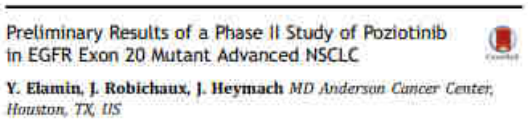
23 août 2018 - **Tagrisso®** (**osimertinib**) a obtenu une nouvelle **AMM** européenne en monothérapie dans le traitement de **première ligne** des patients adultes ...

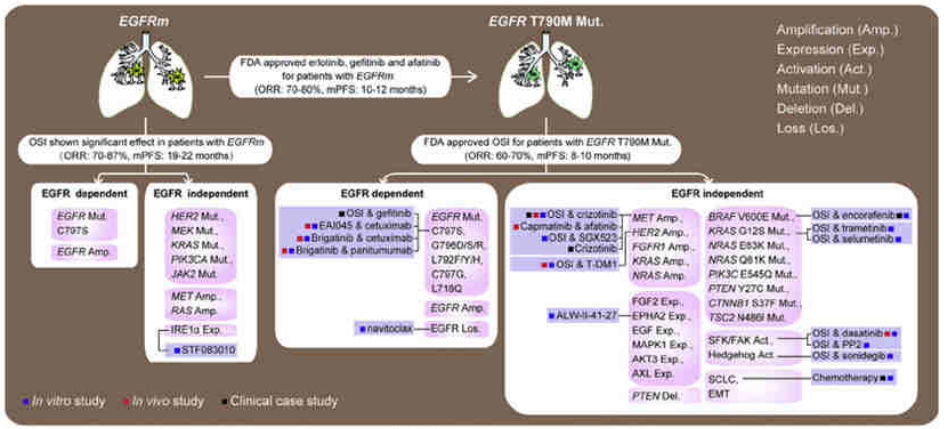
Mutations de résistance
Pourquoi les détecter?



T790M: 50% des patients traités:
Osimertinib AMM

Insertions Exon 20: 10% des anomalies
Poziotinib etc essais





Judith Moser, MD, Lecture Board: Martin Filipits, MD 2017 Springer-Verlag

Osimertinib resistance in non-small cell lung cancer: Mechanisms and therapeutic strategies
Cancer Letters
Volume 420, 28 April 2018, Pages 242-246

AMM Osimertinib première ligne:
Mutations de résistance :

- **C797S 15%,**
- **Autres mutations EGFR, nouvelles molécules en développement**

Sur quoi les détecter

- **Au moment du diagnostic:**
  - Sur biopsie diagnostique
  - Sur ADNtc si biopsie épuisée ou non réalisable (patient très âgé ou altéré)

- **Au moment de la reprise évolutive:**
  - Sur ADNtc en première intention (recos GFCO)
  - Sur rebiopsie si ADNtc négatif

Comment les détecter sur tissu?

TABLE 2. U.S. Food and Drug Administration–Approved Drugs and Companion or Complementary Diagnostics for Non–Small Cell Lung Cancer

Targeted Agents	Tumor	Blood
EGFR		
Erlotinib	cobas EGFR Mutation Test v2	cobas EGFR Mutation Test v2
Gefitinib	Therascreen EGFR RGQ PCR Kit	
Afatinib	Therascreen EGFR RGQ PCR Kit	
Osimertinib	cobas EGFR Mutation Test v2	cobas EGFR Mutation Test v2

2017 ASCO EDUCATIONAL BOOK | asco.org/edbook

- **La méthode employée par la plateforme doit être validée**
- **La cellularité tumorale doit être en adéquation avec la sensibilité déterminée lors de la validation**

Comment les détecter sur ADNtc?

- ADN tc faible fraction de l'ADN circulant total (10-0,01%).
- Techniques capables de détecter ces altérations au sein d'un mélange d'ADN non muté et ADN muté **(<= 1% copies mutées)**
- **PCR spécifique d'allèle**
- **PCR digitale**
- **NGS**

Sensibilité max 70%

TABLE 2. U.S. Food and Drug Administration–Approved Drugs and Companion or Complementary Diagnostics for Non–Small Cell Lung Cancer

Targeted Agents	Tumor	Blood
EGFR		
Erlotinib	cobas EGFR Mutation Test v2	cobas EGFR Mutation Test v2
Gefitinib	Therascreen EGFR RGQ PCR Kit	
Afatinib	Therascreen EGFR RGQ PCR Kit	
Osimertinib	cobas EGFR Mutation Test v2	cobas EGFR Mutation Test v2

Séries	Mutations testées	Stade	T pos / T testées	Se	Sp	Concordance	Méthodes
Kimura *et al.* 2007	EGFR	IV	8/42	75%	97%	93%	Séquençage
Rosell *et al.* 2009	EGFR	IV	164/164	59%	NA	59%	Taqman®
Taniguchi *et al.* 2011	EGFR	IV	44/44	72%	NA	73%	Beaming
Goto *et al.* 2012	EGFR	IIIB/IV	51/86	43%	100%	66%	Scorpion ARMS
Yam *et al.* 2012	EGFR	III/IV	32/37	100%	80%	97%	Taqman®
Zhao *et al.* 2013	EGFR (L858R; del 19)	I to IV	46/111	36%	95%	71%	Mutant enriched PCR
Mok *et al.* 2013	EGFR (G719X; L858R; del 19)	IIIB/IV	89/224	76%	96%	88%	Cobas
Kim *et al.* 2013	EGFR (L858R; del 19)	III/IV	6/40	55%	100%	88%	PNA Clamp
Douillard *et al.* 2013	EGFR (T790M L858R; del 19)	III/IV	105/652	66%	100%	94%	Scorpion ARMS
Oxnard *et al.* 2014	EGFR (L858R; del 19)	_	21/46	67%	100%	85%	PCR digitale en gouttelette
Couraud *et al.* 2014	EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2, PI3KCA	I to IV	50/67	58%	87%	68%	NGS

Couraud S, Vaca-Paniagua F, Villar S *et al.* BioCAST/IFCT-1002 investigators. Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002. Clin Cancer Res. 2014;20(17):4613-24.

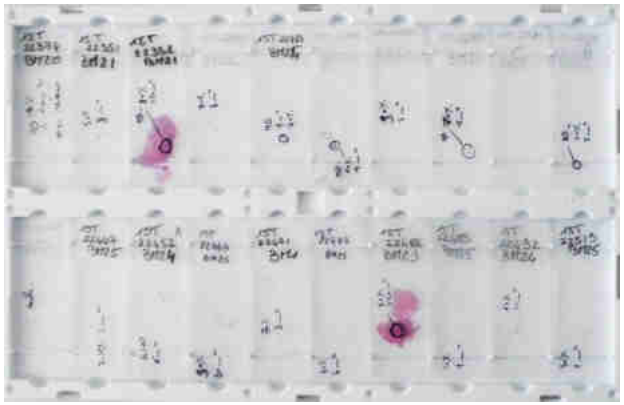
IASLC — IASLC 17TH WORLD CONFERENCE ON LUNG CANCER

Comparison of common T790M mutation detection methods

Parameter	ARMS	Cobas AS-PCR	ddPCR	BEAMing ddPCR	NGS
Sensitivity and detection limit	1.5%	1.5%	<0.1%	0.01%	<5% (based on sequencing depth)
Quantitative	No	Semi-quantitative	Yes	Yes	Yes
Difficulty of experimental operation/data analysis	+	+	++	++	+++
Turnaround time	2-3 days	2-3 days	3-4 days	3-4 days	2-3 weeks
Sensitivity	29%	41%	71%	69%	64% (data from small sample)
Specificity	100%	100%	83%	67%	54% (data from small sample)
Cost	Low	Low	High	High	Relatively high
Approved test kits/instrument	No	No	No	No	No
Disadvantages	Relatively low sensitivity for detecting T790M	Poor compatibility with other equipment	Cannot be used for large-scale multi-locus detection	Still at the laboratory testing phase and is not used at a large-scale	Require professional personnel for data analysis

Première étape extraction

- ***Tissu:***
  - Contrôle morphologique
  - Extraction ADN



Evaluation de la cellularité
AFAQAP

Nombre total de cellules tumorales viables /nombre total de cellules en %

Sur la zone soumise à l'examen moléculaire (=coupe colorée)
Déterminée sur cellules viables (=hors nécrose)
Résultats par tranches:

– Faible cellularité <30% (par tranche de 5%)
– Forte cellularité ≥30% (30, 50, 80)

Le seuil nécessaire dépend de la technique moléculaire appliquée (sensibilité, limite de détection)

Evaluation de la cellularité
gen&tiss

- Éviter mucus et nécrose lors de la macrodissection
- Quantifier la nécrose en terme de surface
- Macrodissection si <50% de cellules tumorales
- Si très peu de matériel: % de cellules tumorales et nombre (>100?)

- ***ADNtc:***
  - Tubes adaptés
  - Plasma
  - Extraction kit spécifique

TUBES DPNI, STREK, ADNc

Intérêt : conservation du sang à température ambiante jusqu' à 10 jours

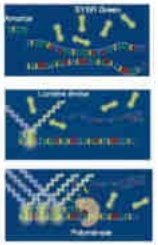
Conservateur (sans formaldéhyde) stabilisant les cellules sanguines
pas de relargage de l'ADN génomique
pas de dilution des ADN circulants

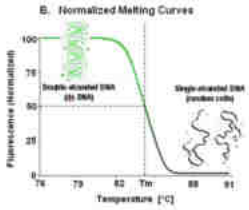
Coût : 7 à 10 euros

Tissu: criblage + séquençage direct Sanger >2010

HRM

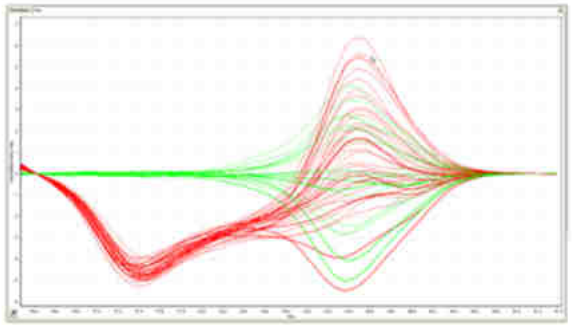
Technique qui permet, après une PCR, de discriminer, sur une montée en température très progressive, les différents variants amplifiés, avec un fluorochrome intercalant qui sature les structures doubles brins et permet de distinguer des variations, même d'une seule base, selon le profil de dénaturation.

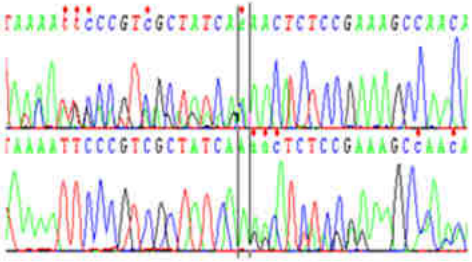




Délétion: EGFR Exon 19

5%





>10%

Ou Taqman ciblé
Ou Pyroséquençage
Ou Snapshot

Limite de détection 5%

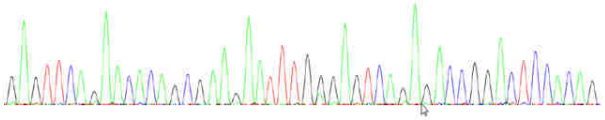
2015 Virage du NGS
(Next Generation Sequencing)

- Augmentation du nombre de cibles et de molécules
- Inclusion essais multicibles

Technique conventionnelle	NGS
1 technique 1 cible Multiplex maxi 10	1 technique= un panel
3 jours 30 cibles	1,5 jours=16 gènes

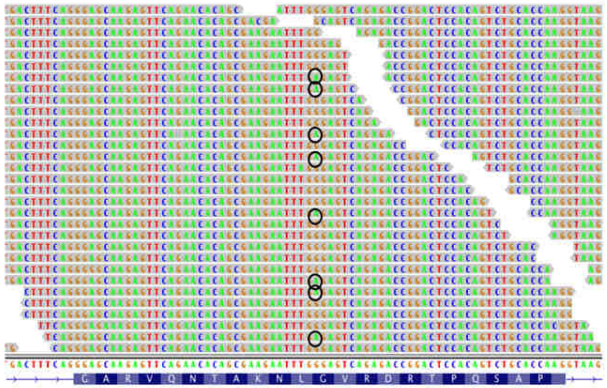
Old:

Capillary Sequencing, a.k.a. "Sanger" sequencing



New:

Next-Generation Sequencing, a.k.a. Massively Parallel Sequencing



INSTITUT NATIONAL DU CANCER

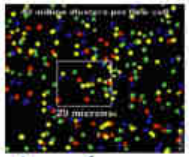
Gene	Exons / hotspots	Associated molecules	Clinical utility
AKT1	3	AKT inhibitors	Clinical trials
ALK	23+24+25	crizotinib, ALK inhibitors	AcSé program, Clinical trials
BRAF	11+15	vemurafenib, dabrafenib	Full Marketing Authorisation (FMA)
EGFR	18+19+20+21	anti-EGFR	FMA
ERBB2 (HER2)	20	trastuzumab, neratinib	Clinical trials
ERBB4	10+12 (E452K and R393W)	Afatinib	Clinical trials
FGFR2	7+12+14 (S252, N549, K659)	FGFR inhibitors	Clinical trials
FGFR3	7+9+14 (R248 to S249 and G370 to Y373)	FGFR inhibitors	Clinical trials
HRAS	2+3+4	MEK inhibitors	Clinical trials
KIT	8+9+11+13+17+18	imatinib	FMA
KRAS	2+3+4	panitumumab, cetuximab	FMA
MAP2K1 (MEK1)	2	MEK inhibitors	Clinical trials
MET	2+14+15+16+17+18+19+20	crizotinib	AcSé program
NRAS	2+3+4	panitumumab, MEK inhibitors, BRAF inhibitors	pre-FMA, Clinical trials
PDGFRA	12+14+18	imatinib	FMA
PIK3CA	10+21	PI3K inhibitors	Clinical trials

- Constitution d'une librairie (fragments d'acides nucléiques avec amorces, adaptateurs et identifiants)
- Amplification de la librairie (clusters)
- Séquençage massif parallèle

Illumina MiSeq

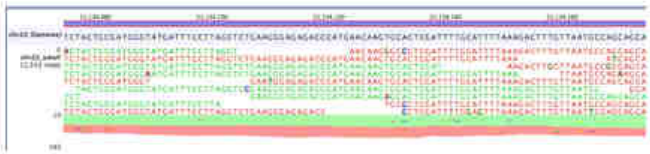
Ion Torrent PGM

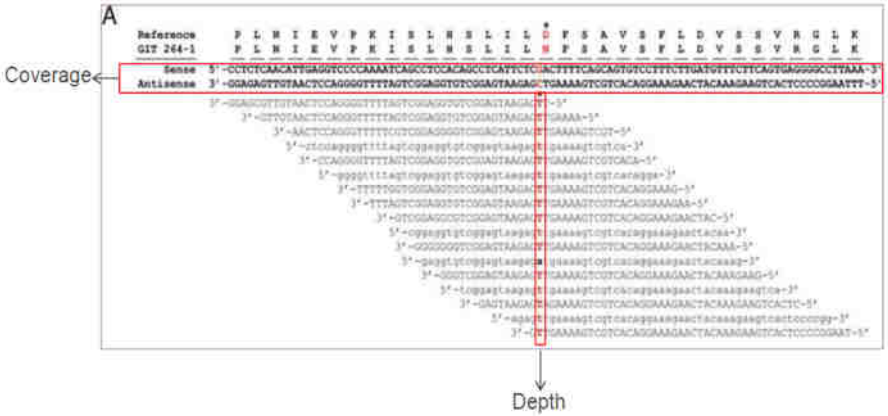
- Données brutes



- Détermination de la séquence (base calling)

- Alignement au génome de référence (mapping)



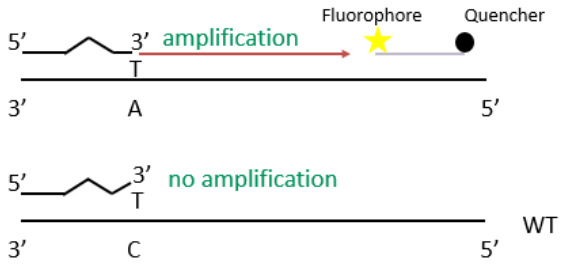


- **Coverage** : zone du génome couverte lors du séquençage
- **Profondeur** : nombre de fois que chaque base sera séquencée

- Comparaison ADN d'intérêt /ADN référence (polymorphismes, mutations, indels (variant calling)

Un grand nombre de données brutes générées
Nécessité d'un traitement bioinformatique des données
Importance de la couverture et de la profondeur de séquence
Quantité ADN, coût, délais de réponse allongés
Sensibilité 1 à 5%

ADN tc: Techniques de PCR allèle spécifique



Les primers sont designés pour ne se lier qu'à la séquence mutée

On amplifie seulement cette séquence

La détection se fait par émission de fluorescence

- **Kit Therascreen (Qiagen)**

Exon	Mutation	COSMIC* ID	Base change	LOD (% mutant) Low	LOD (% mutant) High
18	G719A	6239	2156G>C	7.41[1]	1.57[1]
	G719S	6252	2155G>A	5.08[1]	7.75[1]
	G719C	6253	2155G>T	10.3[1]	✗
19	Deletions	12384	2237_2255>T	1.38[1]	0.49[1]
		12387	2239_2258>CA	4.91[1]	1.48[1]
		12419	2238_2252>GCA	16.87[1]	12.47[1]
		12422	2238_2248>GC	3.24[1]	1.65[1]
		13551	2235_2252>AAT	4.24[1]	1.41[1]
		12678	2237_2251del15	0.55[1]	0.24[1]
		6218	2239_2247del9	8.47[1]	✗
		12728	2236_2253del18	2.43[1]	✗
		12367	2237_2254del18	2.72[1]	✗
		6210	2240_2251del12	4.09[1]	✗
		6220	2238_2255del18	2.70[1]	0.82[1]
		6222	2235_2249del15	6.40[1]	1.63[1]
		6225	2236_2250del15	2.80[1]	1.42[1]
		6254	2239_2253del15	0.86[1]	0.47[1]
		6255	2239_2256del18	0.14[1]	0.05[1]
		12369	2240_2254del15	4.94[1]	1.56[1]
		12370	2240_2257del18	8.10[1]	2.08[1]

* COSMIC: Catalogue of somatic mutations in cancer: http://cancer.sanger.ac.uk/

QIAGEN®

Exon	Mutation	COSMIC* ID	Base change	LOD (% mutant) Low	LOD (% mutant) High
19	Deletions	12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0.25[1]	0.10[1]
		12383	2239_2251>C	4.58[1]	1.74[1]
20	S768I	6241	2303G>T	7.66[1]	2.18[1]
	Insertions	12376	2307_2308ins GCCAGCGTG	11.61[1]	✗
		12378	2310_2311ins GGT	4.91[1]	1.31[1]
		12377	2319_2320ins CAC	2.40[1]	0.65[1]
	T790M	6240	2369C>T	9.72[1]	5.09[1]
21	L858R	6224	2573T>G	5.94[1]	1.13[1]
	L861Q	6213	2582T>A	2.22[1]	0.66[1]

- **Kit Cobas Roche**

Tableau 1 : Le test cobas® EGFR est conçu pour détecter les mutations suivantes

Exon	Groupe de mutations EGFR	Séquence d'acides nucléiques EGFR	ID COSMIC[1]
Exon 18	G719X	2156G>C	6239
		2155G>A	6252
		2155G>T	6253
Exon 19	Ex19Del	2240_2251del12	6210
		2239_2243del5	6218
		2238_2255del18	6220
		2236_2249del15	6222
		2236_2250del15	6225
		2239_2253del15	6254
		2239_2256del18	6255
		2237_2254del18	12367
		2240_2254del15	12369
		2240_2257del18	12370
		2240_2248TTAAGAGAAG>C	12382
		2239_2251>C	12383
		2237_2255>T	12384
		2235_2252>AAT	12386
		2237_2252>T	12386
		2239_2258>CA	12387
		2239_2258>CAA	12403
		2237_2253>TTGCT	12416
		2238_2252>GCA	12419
		2238_2248>GC	12422
		2237_2251del15	12678
		2236_2253del18	12728
		2235_2248>AATTC	13550
		2235_2252>AAT	13551
		2235_2251>AATTC	13552
		2253_2276del24	13554
		2232_2257>TCT	16427
		2238_2255del15	23671
		2233_2247del15	26038
Exon 20	S768I	2303G>T	6241
	T790M	2369C>T	6240
	Ex20ins	2307_2308ins9GCCAGCGTG	12376
		2319_2320insCAC	12377
		2310_2311insGGT	12378
		2311_2312ins9GCCTGCACA	13408
		2309_2310AC>GCAGCGTGGAT	13668
Exon 21	L858R	2573T>G	6224
		2573_2574ins3GT	12429
	L861Q	2582T>A	6213

BIOPATHOLOGIE

cobas® 4800

cobas EGFR Plasma P1 Test Report

Start of run:	04-Feb-2016 14:08:50
System:	o4-CZC1196HTK
Serial No.:	z 480: 50826
Test version:	1.0.1
Operator:	Labmanager
Printed By:	Labmanager

MWP ID:	HD2608756
cfDNA Sample Prep Kit-ID #1:	AD2W121642H004C
Lot / Exp Date:	W12164 / Mar-2017
EGFR Mut Test v2 Kit-ID #1:	IA1W087921H00CD
Lot / Exp Date:	W08792 / Feb-2017

Run name 04-FEB-2016 14:08 EGFR Plasma P1

Test status: VALID

Controls

Position	Sample ID	Kit	Control Type	Result	Flags	Accepted by
A01:A02:A03	IA1W087921H00CD	1	Mutant Control	Valid		
B01:B02:B03	IA1W087921H00CD	1	Negative Control	Valid		

Specimens

Position	Sample ID	Kit	Result 1	Result 2	Result 3	Flags	Accepted by
C01:C02:C03	16T054051	1	Mutation Detected	L861Q	L861Q: 9.33		
D01:D02:D03	16T056566	1	Mutation Detected	Ex19Del	Ex19Del: 10.73		
E01:E02:E03	16T056929	1	Invalid	N/A	N/A	R852	

Rapidité
Rapport automatisé
Semi-quantitatif

Contrôle Horizon (100 copies/ ml)

Limite de détection Cobas

Controls

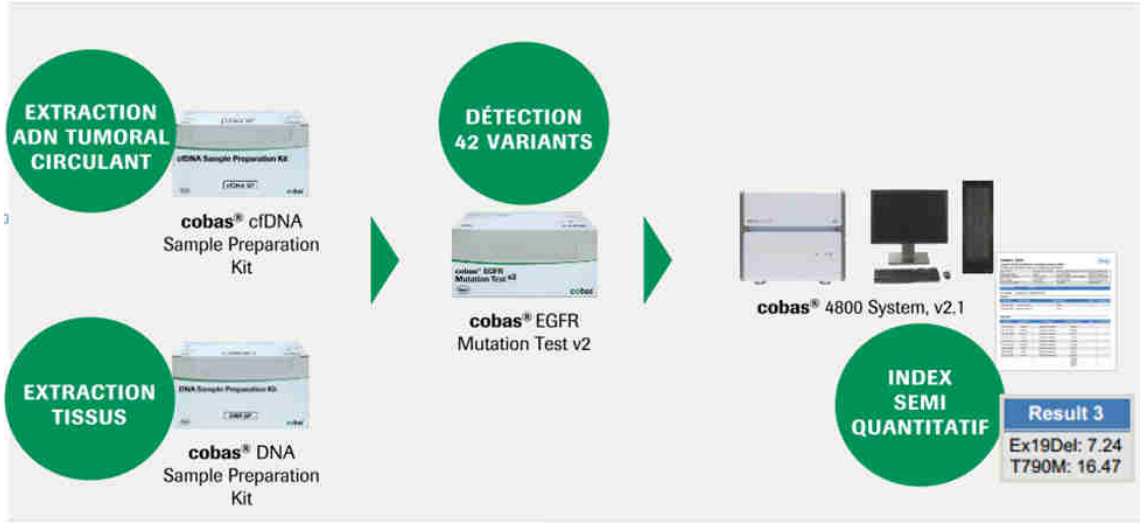
Position	Sample ID	Kit	Control Type	Result	
A01:A02:A03	IA1W114383H00BM	1	Mutant Control	Valid	
B01:B02:B03	IA1W114383H00BM	1	Negative Control	Valid	

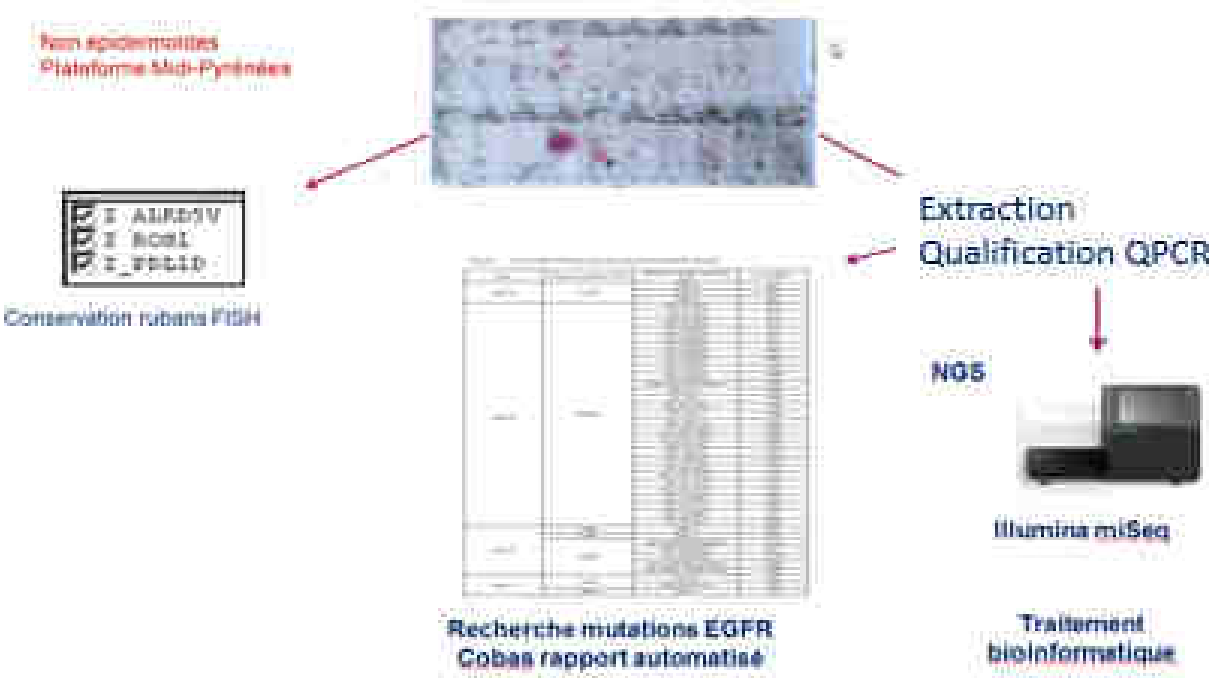
Specimens

Position	Sample ID	Kit	Result 1	Result 2	Result 3
C01:C02:C03	16T014086	1	Mutation Detected	Ex19Del	Ex19Del: 9.47
D01:D02:D03	16T014088	1	Mutation Detected	S768I G719X	S768I: 5.13 G719X: 3.12
E01:E02:E03	Horizon WT	1	Mutation Detected	G719X	G719X: 7.69
F01:F02:F03	Horizon 5%	1	Mutation Detected	Ex19Del L858R T790M G719X Ex20Ins	Ex19Del: 16.76 L858R: 11.01 T790M: 12.51 G719X: 7.62 Ex20Ins: 5.95
G01:G02:G03	Horizon 1%	1	Mutation Detected	Ex19Del L858R T790M G719X Ex20Ins	Ex19Del: 13.78 L858R: 9.04 T790M: 9.71 G719X: 7.78 Ex20Ins: 3.34
H01:H02:H03	Horizon 0.1%	1	Mutation Detected	Ex19Del L858R G719X	Ex19Del: 11.26 L858R: 6.52 G719X: 7.71

« boîte noire »
Limite de détection variable selon les mutations

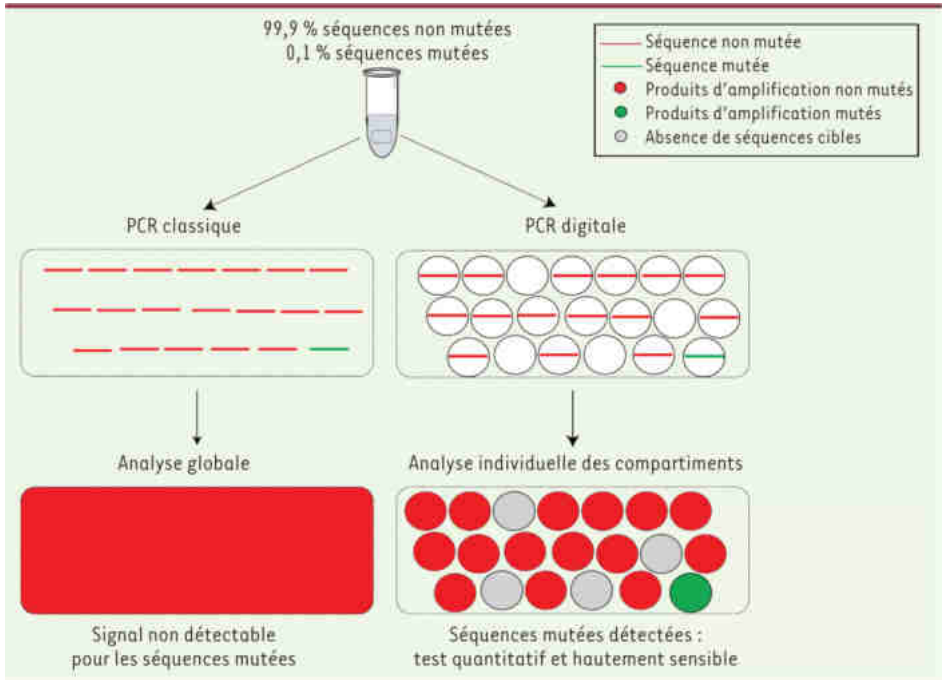
Rapidité
Kit tissu



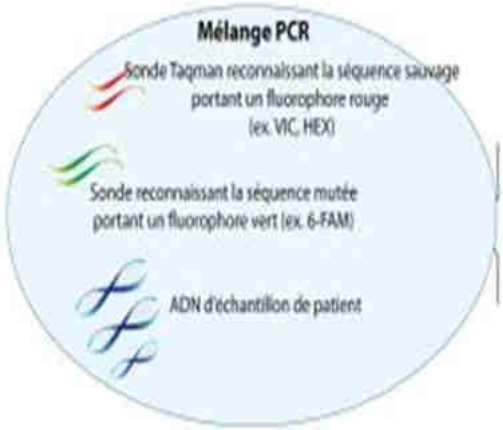


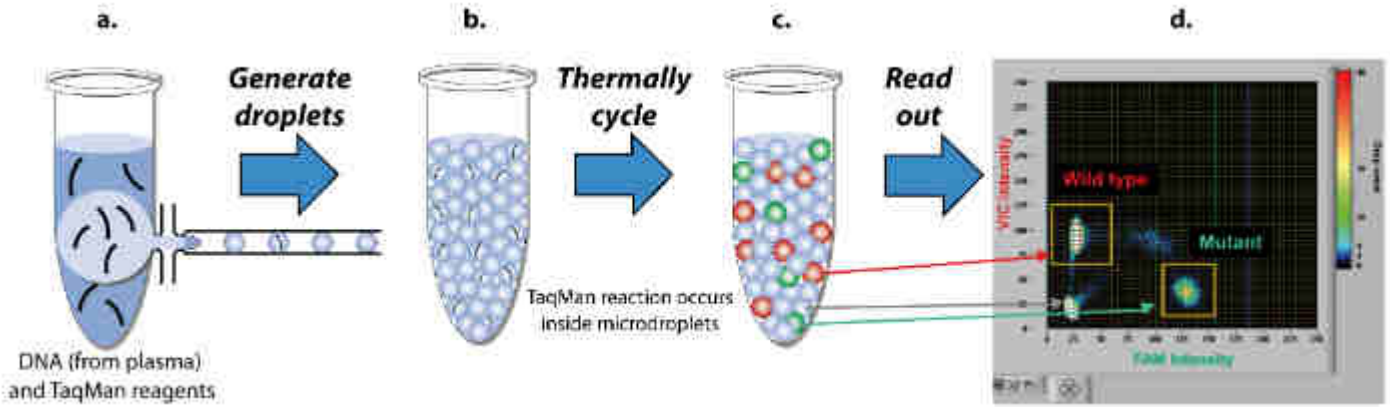
ADN non qualifié pour NGS

ADN tc: Technique de digital droplet PCR



Détection d'une copie





	NGS	Cobas	ddPCR
Sensibilité	1 à 5% ciblé classique 0,1% capture optimisée	0,1 à 1% selon mutation	<0,001%
Multiplexage	Oui >100 Panel à exome	Oui (49 mutations détectées)	5 à 10 cibles
Analyse des résultats	Complexe, bioinformatique Délai réponse>	Simple rapport automatisé	simple
Applications	Analyse globale sans a priori, suivi hétérogéneité tumorale Tissu ou sang selon techno et bioinfo	Détection rapide sur tissu et sang circulant	Analyse et suivi d'un ou plusieurs marqueurs Adaptation rapide nouvelles cibles (C797S) Validation résultat séquençage

Circulaire DGOS Février 2018, puis Avril 2018:

Liste complémentaire			RIHN		
Acte évalué par l'HAS mais non encore passé à la nomenclature CCAM			**Acte innovant en cours d'évaluation**		
N503	Séquençage EGFR : 2 exons	180,90 €	N452	Forfait séquençage haut débit (NGS) < 20 kb	882,90 €
N504	Séquençage EGFR : 4 exons	315,90 €	N453	Forfait séquençage haut débit (NGS) > 20 kb et < 100 kb	1 503,90 €
			N454	Forfait séquençage haut débit (NGS) > 100 kb et < 500 kb	2 205,90 €

Technical sheet

Idylla™ EGFR Mutation Assay

Specimen requirements	
Sample Type	1 x 5µm FFPE tissue section
Neoplastic cells	≥10% if less macrodissection is required

Primodétection EGFR: Place pour des technologies faciles à mettre en œuvre hors plateforme

Conclusion

- Dans un monde idéal: toutes les anomalies sur circulant?
- Mais sensibilité moindre, déploiement des techniques hypersensibles optimisées difficile
- L'analyse sur tissu reste le gold standard au diagnostic et à la rechute si l'ADNtc est négatif
- Le pathologiste reste au centre du processus avec nécessité:
- D'un préanalytique irréprochable,
- D'une épargne tissulaire maximale au diagnostic
- D'une évaluation correcte de la cellularité
- Guidelines recommandations formations
- Plateformes: contraintes d'adaptation à l'évolution des cibles, contraintes financières, RIHN : passage routine EGFR au privé

Question 2: Quelle(s) est (sont) la(es) proposition(s) exacte(s) concernant les mutations de résistance

- A. la mutation T790M est le principal mécanisme de résistance aux ITK de première génération
- B. Les insertions de l'exon 20 n'apparaissent que sous traitement par ITK de l'EGFR
- C. La mutation C797S est sensible aux ITK de troisième génération
- D. La détection de la T790M dans le sang circulant nécessite des techniques très sensibles
- E. La recherche de la T790M d'EGFR peut se faire en première intention sur l'ADNtc

Question 2: Quelle(s) est (sont) la(es) proposition(s) exacte(s) concernant les mutations de résistance

- A. la mutation T790M est le principal mécanisme de résistance aux ITK de première génération
- B. Les insertions de l'exon 20 n'apparaissent que sous traitement par ITK de l'EGFR
- C. La mutation C797S est sensible aux ITK de troisième génération
- D. La détection de la T790M dans le sang circulant nécessite des techniques très sensibles
- E. La recherche de la T790M d'EGFR peut se faire en première intention sur l'ADNtc