RECHERCHE DE TRANSCRITS DE FUSION PAR NGS À PARTIR DE L'ARN EXTRAIT DE BLOCS DE TISSU FIXÉ DANS LE FORMOL

J. SAUGE (1), B. TOURNIER (2), S. RAMLA (1), G. TARRIS (1), A. MILLIERE (1), M. AUBRY (2), C. PIOCHE (2), MH. AUBRIOT-LORTON (1, 2), L. MARTIN (1, 2), C. CHAPUSOT (2)

(1) SERVICE DE PATHOLOGIE, CHU DIJON

(2) PLATEFORME DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES CANCERS, CHU DIJON

INTRODUCTION

- Réarrangements chromosomiques : altérations somatiques les plus communes des cancers
- Certains réarrangements (ALK, ROS1, NTRK, RET) sont actionnables
- Protéines de fusion détectées par immunohistochimie
- Confirmation moléculaire le plus souvent par FISH
- Augmentation du nombre de cibles et du nombre de pathologies : intérêt du NGS

OBJECTIF

- Rechercher des transcrits de fusion par NGS, à partir de l'ARN extrait de blocs de tissus fixés dans le formol, provenant de différents types de cancers (poumon, thyroïde, colon, œsophage, cerveau)
- Comparer NGS et FISH (ALK)

MATERIELS ET METHODES

CRITÈRES D'INCLUSION

- Prélèvements du 01/12/2019 au 30/04/2020
- Adénocarcinome pulmonaire (n = 42)
- Autres cancers (n = 28) à la demande des cliniciens (thyroïde, voies biliaires, cerveau)

IMMUNOHISTOCHIMIE

- Automate OMNIS Dako-Agilent
- Détection des protéines de fusions : ALK (Abcam, 5A4, 1/30), ROS1 (Cell signaling, D4D6, 1/1000), NTRK (Clone EPR17341, ABCAM)
- Détection de MET (sp44, ventana roche)
- EGFR et FGFR3 non recherchés

EXTRACTION

- Co-extraction ADN et ARN (Maxwell Promega)
- Intérêt pour les petits prélèvements

SÉQUENÇAGE D'AMPLICONS DE PCR (*STS PLUS BY SOPHIA GENETICS* ©)

- Détection de 137 transcrits de fusions connus
  - *ALK, ROS, RET, NTRK1/3, FGFR3, EGFr, MET*
  - amorces de PCR de part et d'autre des points de fusion (respectivement 97 et 68)
- Détection potentielle de 6596 fusions
- Mise en évidence des altérations actionnables les plus fréquentes impliquant les gènes *ALK, ROS, RET, NTRK1/3, FGFR3* ainsi que les transcrits alternatifs *EGFr vIII* et le saut d'épissage de l'exon 14 du gène *MET*.

FISH

- ALK (IQFISH, break-appart, dako omnis agilent)
- Automate OMNIS Dako-Agilent
- Cas positifs en IHC et/ou STS plus

RÉSULTATS

RESULTATS PRE-ANALYTIQUES

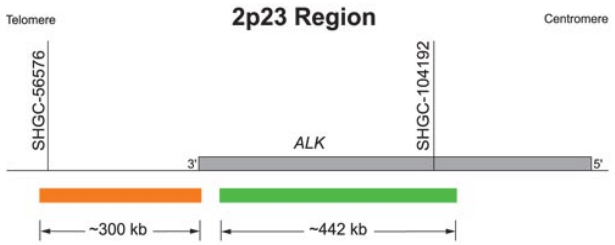
- 4 cytoblocs, 33 biopsies, 33 pièces opératoires
- Pourcentage de cellules tumorales : < 20 à 90 %
  - Médiane 70±20
  - 9 cas : % de cellules tumorales < 30 %
- Concentration d'ARN : 5,18 à 410 ng/µL
  - Médiane 69,5±86
  - 5 cas : concentration < 10 ng/µl

PANEL STS+

- Transcrits de fusion 13/70 cancers (18,5 %) (n = 70)
  - 7 cancers du poumon (3 EML_4-ALK, 1 EML_4-MET et 1 MET exon 13-MET exon 15)
  - 5 gliomes de haut grade (3 EGFR exon 1-EGFR exon 8, 1 FGFR3-TACC3)
  - 1 cancer de la thyroïde (TPM3-NTRK1)
- Analyse non contributive dans 3 cas (4 %)
  - faible quantité d'ARN (< 10ng/µl)
  - faible pourcentage de cellules tumorales (< 30%).

Fused Gene 5' Fused Gene 3'	Exon 5' Exon 3'	Read Count % Supporting Reads	Unique Molecule Count % Supporting Unique Molecules	cDNA Sequence 5' cDNA Sequence 3'
ETV6 *NTRK3*	4 14	12859 99.63 %	1339 99.78 %	GCCGGAGGTCATACTGCATCAGAACCATGAAGAAG GTCCCGTGGCTGTCATCAGTGGTGAGGAGGACTCA

FISH



LSI ALK Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe

- Transcrits de fusion ALK : 4 des 6 cancers testés (n = 6)
  - 4 cancers du poumon
- Analyse non contributive dans 1 cas (16 %) :
  - 1 cytologie pleurale ALK- en FISH avec transcrit de fusion ALK (STS+)

IHC

- **IHC positives en cas de réarrangement ALK, MET et NTRK**
- Transcrits de fusion NTRK (n = 1)
  - Au total : 4 IHC+ et 3 IHC douteuse
    - Dont 3 IHC+ et 3 IHC douteuse : sans transcrit de fusion identifié en NGS
- Transcrits de fusion ALK (n = 7)
  - Au total : 9 IHC+
    - Dont 2 IHC+ sans transcrit de fusion identifiée (FISH et STS+)
- Réarrangement de MET (n = 3)
  - Au total : 1 IHC positive (avec amplification en plus du réarrangement)

CAS « DISCORDANTS »

- 3 NGS NC (concentration en ARN < 10 ng/µL)
  - 3 FISH + : 1 cytologie, 2 biopsies

- 1 FISH ALK NC
  - NGS + : 1 cytologie avec un pourcentage de cellules tumorales < 20 %

DISCUSSION

- Résultats STS+ comparable à la FISH
- STS+ moins chronophage pour les pathologistes
- Compatible avec l’augmentation du nombre de cibles actionnables à analyser
  - petits prélèvements compris
- Possibilité de screening par IHC pour ALK, ROS1, NTRK1 et EGFR

CONCLUSION

- Mise en place STS+ en routine fin 2019
- FISH réservée aux cas non éligibles au NGS
  - Petits prélèvements (cytologie, cytoponction)
  - Cellularité faible
  - ARN dégradé

DISCUSSION

- La recherche des transcrits de fusion apporte des informations complémentaires à la caractérisation des mutations au niveau de l'ADN.
- Améliore la prise en charge personnalisée des patients atteints de cancer métastatique.
- La mise en place en routine du panel STS+ va permettre d'évaluer la fréquence des cancers avec un transcrit de fusion pouvant bénéficier d'une thérapie ciblée.

MERCI DE VOTRE ATTENTION