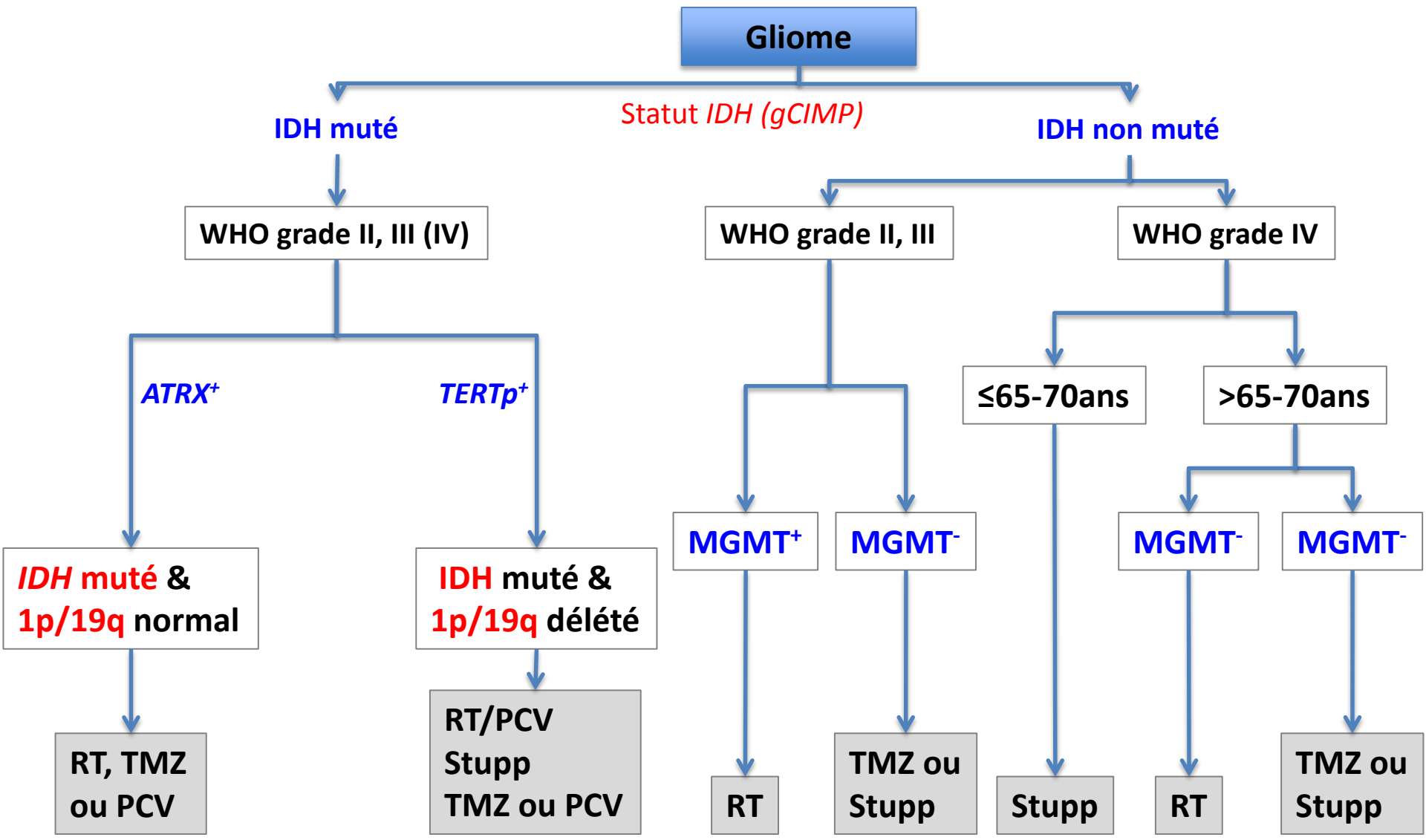


Aide au diagnostic des gliomes par biologie moléculaire

Jean Mosser

*« Oncogénomique translationnelle », IGDR, UMR6290 CNRS UR1
Plateforme Génomique environnementale et humaine, UR1, Biogenouest, IBiSA
Service de Génétique Moléculaire et Génomique, CHU de Rennes*



OS 97 mois

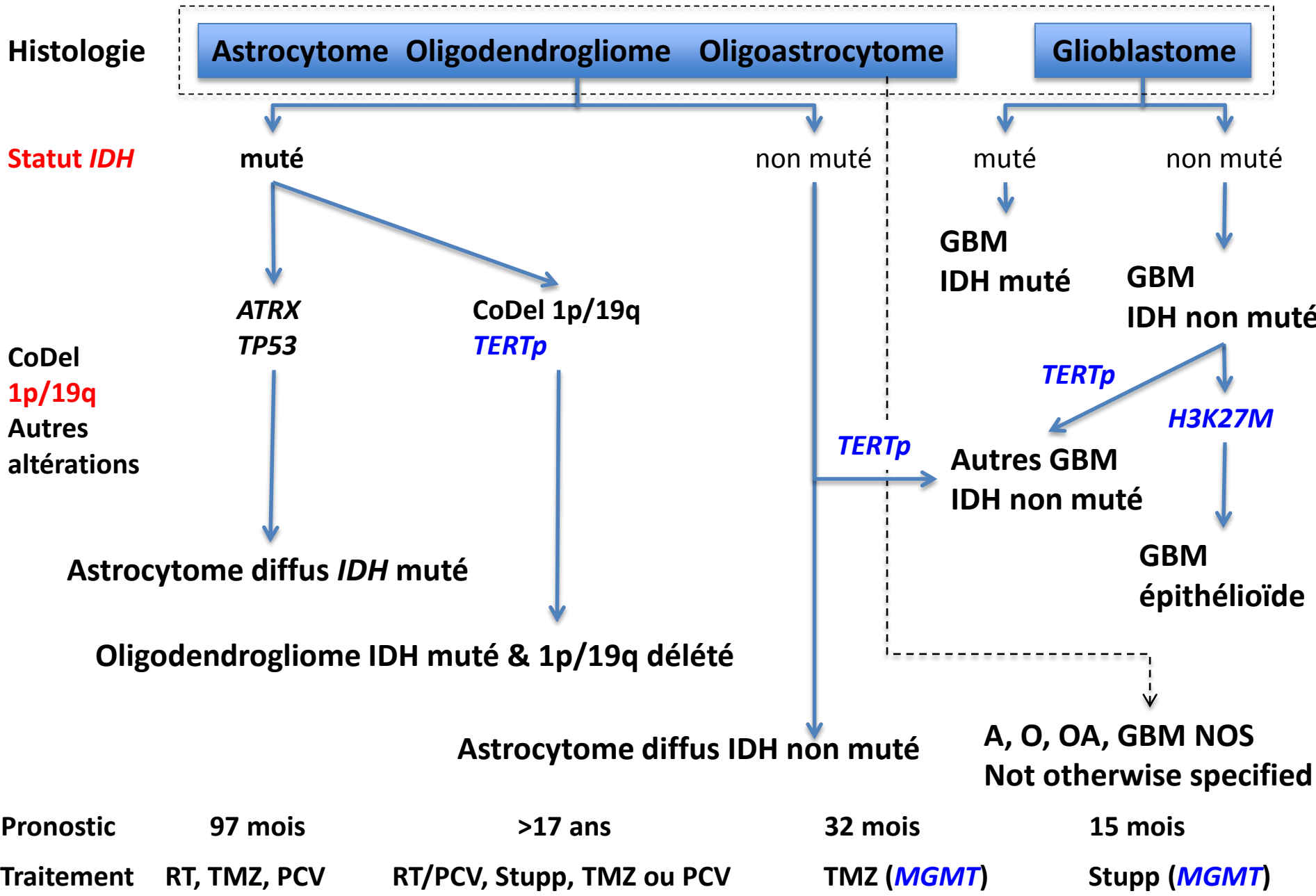
>17 ans

32 mois

15 mois

Classification des gliomes : vision du pathologiste

(d'après Figarella POLA, 2015)



Marqueurs d'intérêt

Diagnostiques : *IDH1, IDH2, 1p19q (TERTp)*

Pronostiques : *IDH1, IDH2, 1p19q, TERTp, MGMT-m*

Surrogates : *TERTp (1p19q)* : réduction des couts, suivi

théranostiques : *IDH1, IDH2, 1p19q, TERTp, MGMT-m*

Essais cliniques : *FGFR3,1 [Target], IDH1; EGFRvIII, BRAF [AcSe]*

Marqueurs d'intérêt indispensables

Diagnostiques : **IDH1, IDH2, 1p19q**

Pronostiques : IDH1, IDH2, 1p19q, TERTp, MGMT-m

Surrogates : **TERTp** (1p19q; 0,99) : réduction des couts, suivi

théranostiques : IDH1, IDH2, 1p19q, TERTp, **MGMT-m**

Essais cliniques : FGFR3,1 [Target], IDH1; EGFRvIII, BRAF [AcSe]

Immunohistochimie :

IDH1p.R132H, perte de d'expression d'*ATRX*...

Cytogénétique :

1p19q, *FGFR1, 3*

FHGR1,3; EGFRvIII

Génétique moléculaire :

IDH1, IDH2, (TERTp), MGMT

Approche dédiée : PCR-ARMS, Pyroséquencage...

Approche exhaustive : NGS sur panel de gènes (Rennes)

Intérêt du Séquençage massivement parallèle NGS : « Next Generation Sequencing »

Expérience rennaise

INTERET DU NGS : nanoT → parallélisation du séquençage

Analyse simultanée de plusieurs dizaine d'altérations sur plusieurs dizaine de patients

Modification du concept :

Organe, clinique, grade... → Profil moléculaire tumoral

Diagnostic, Pronostic, Stratégie thérapeutique

Essais « basket » guidé par une altération drugable indep du type de cancer (AcSe)

Essais « umbrella » plusieurs drogues / 1 seul cancer (génotypage exhaustif)

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

-> NGS

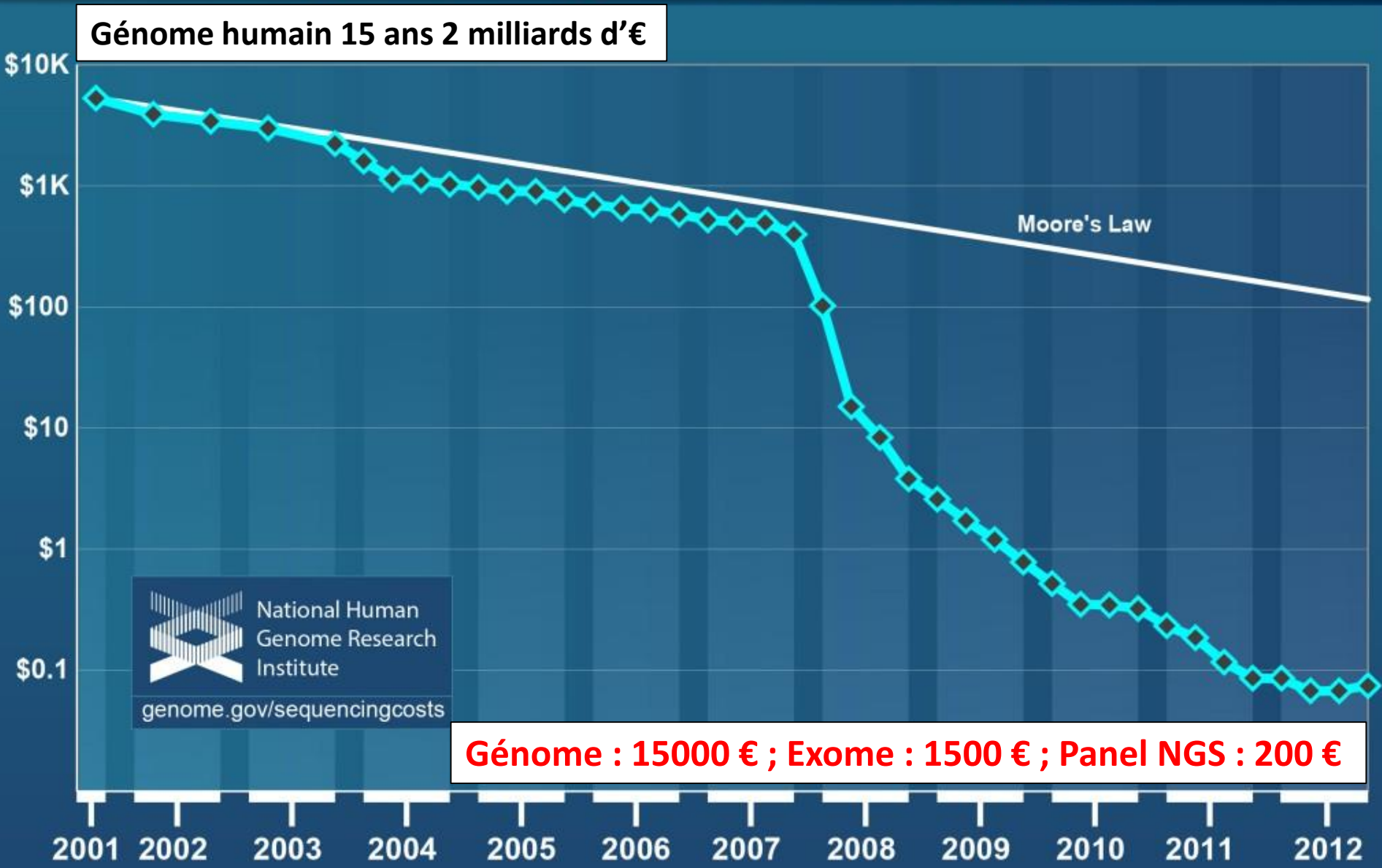
Diagnostic : quelques dizaines – centaine de cibles a tester simultanément

Séquençage massivement parallèle : réduction du cout du séquençage



 National Human
Genome Research
Institute
genome.gov/sequencingcosts

Séquençage massivement parallèle : réduction du cout du séquençage



Cout 10^{-6} ; durée 10^{-3} -> Diagnostic en routine de quelques dizaines de gènes

Développer le séquençage haut-débit pour le diagnostic des tumeurs solides en respectant ces contraintes

- ✓ **Haut-débit** Nombre patients (60-80/semaine)
Nombre marqueurs (20 gènes)
- ✓ **Rapide** Délais de rendu de résultat (7 – 10 jours)
- ✓ **Flexible** Evolution des thérapies ciblées – gestion des résistances
- ✓ **Econome** € (INCa)
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

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

Gene	Exons
BRAF*	Ex11 Ex15
EGFR*	Ex18 Ex19 Ex20 Ex21
ERBB2	Ex20
IDH1**	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 AcSe

Gene	Exons
AKT1	Ex3
CTNNB1**	Ex3
ERBB4	Ex10 Ex12
FGFR2	Ex7 Ex9 Ex12 Ex14
FGFR3	Ex7 Ex9 Ex14 Ex16
HRAS	Ex2 Ex3 Ex4
IDH2**	Ex4
KIT*	Ex8 Ex9 Ex14
MAP2K1	Ex2
PIK3CA**	Ex10 Ex21
PTEN	Ex7

→ Thérapies ciblées
(AMM, ATU, biomarqueur)



Panel_V6 en cours (≈ 30 gènes – ≈ 180 amp, **TRETp**, **H3F3A**)

→ BdD, Essais cliniques...

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

Gene	Exons
BRAF*	Ex11 Ex15
EGFR*	Ex18 Ex19 Ex20 Ex21
ERBB2	Ex20
IDH1**	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



Actes référencés RIHN
 **Liste principale
 *Liste complémentaire
 **NGS < 20kb

Gene	Exons
AKT1	Ex3
CTNNB1**	Ex3
ERBB4	Ex10 Ex12
FGFR2	Ex7 Ex9 Ex12 Ex14
FGFR3	Ex7 Ex9 Ex14 Ex16
HRAS	Ex2 Ex3 Ex4
IDH2**	Ex4
KIT*	Ex8 Ex9 Ex14
MAP2K1	Ex2
PIK3CA**	Ex10 Ex21
PTEN	Ex7

Workflow rennais

Production de la librairie (amplicon)

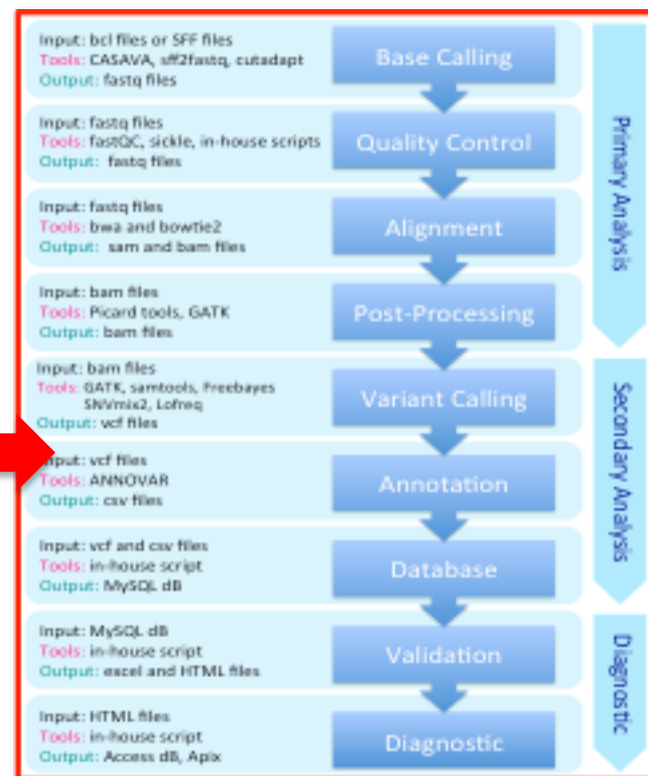


Préparation des librairies

Séquençage (MiSeq)



Variant DX : pipeline automatisé



Pipeline d'analyses

=> Estimation de la performance de l'ensemble du workflow

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



2014 : LE NGS EST EN ROUTINE

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

Sensibilité 77,4%
Spécificité 98,4%

CTRL : 584
FFPE: 3366

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 (gliome inclus)

-> n > 6000 patients testés sur plus de 100 amplicons

2014 : LE NGS EST EN ROUTINE

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

Sensibilité 77,4%
Spécificité 98,4%

CTRL : 584
FFPE: 3366

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

-> n > 6000 patients testés sur plus de 100 amplicons

NGS comparé échantillons FFPE vs plasma (n= 47 CBNPC)

Sensibilité 93%
Spécificité 100%
Concordance 90%

2014 : LE NGS EST EN ROUTINE

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

Sensibilité 77,4%
Spécificité 98,4%

CTRL : 584
FFPE: 3366

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
-> n > 6000 patients testés sur plus de 100 amplicons

NGS comparé échantillons FFPE vs (7)

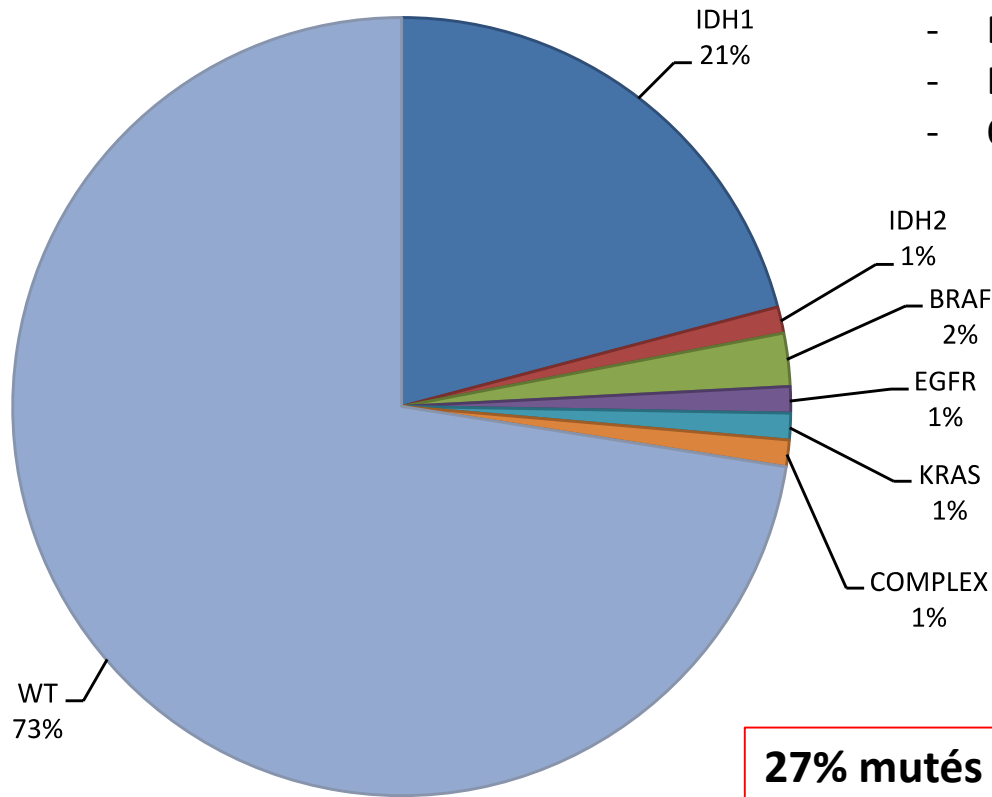
The pooled
sensitivity = 0.620 [95% CI, 0.513–0.716)
specificity = 0.959 (95% CI, 0.929–0.977)

Sensibilité 93%
Spécificité 100%
Concordance 90%

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

STRATIFICATION MOLECULAIRE : Gliomes (91 patients)

Molecular stratification n = 91



Routine diagnosis: Pyrosequencing

- IDH1 statut

Innovative NGS technology: Funding: INCa_NGS

- IDH1,2: diagnostic, pronostic marker, clinical trials
- BRAF: AcSe-Vemurafenib
- EGFR: EGFR-TKI
- Others...

27% mutés

73% WT

-> améliorer le panel : TERTp, H3F3A...

-> RNASeq? : EGFRvIII, FGFR3-TACC3, FGFR1-TACC1

CR classique : CR AMM, diagnostic (EGFRs, IDH)

RCP moléculaire mensuelle

**Mise en place organisationnelle depuis juillet 2014
Effective 1er janvier 2015**

**Périmètre : Bretagne (Pole Régional de Cancérologie)
Coordination : Rennes**

Médecins référents :

digestif, pneumo, dermato, neuro, oncopédiatrie, gyneco, oncogénétique...

Biologistes : généticiens, cytogénéticiens, pathologistes

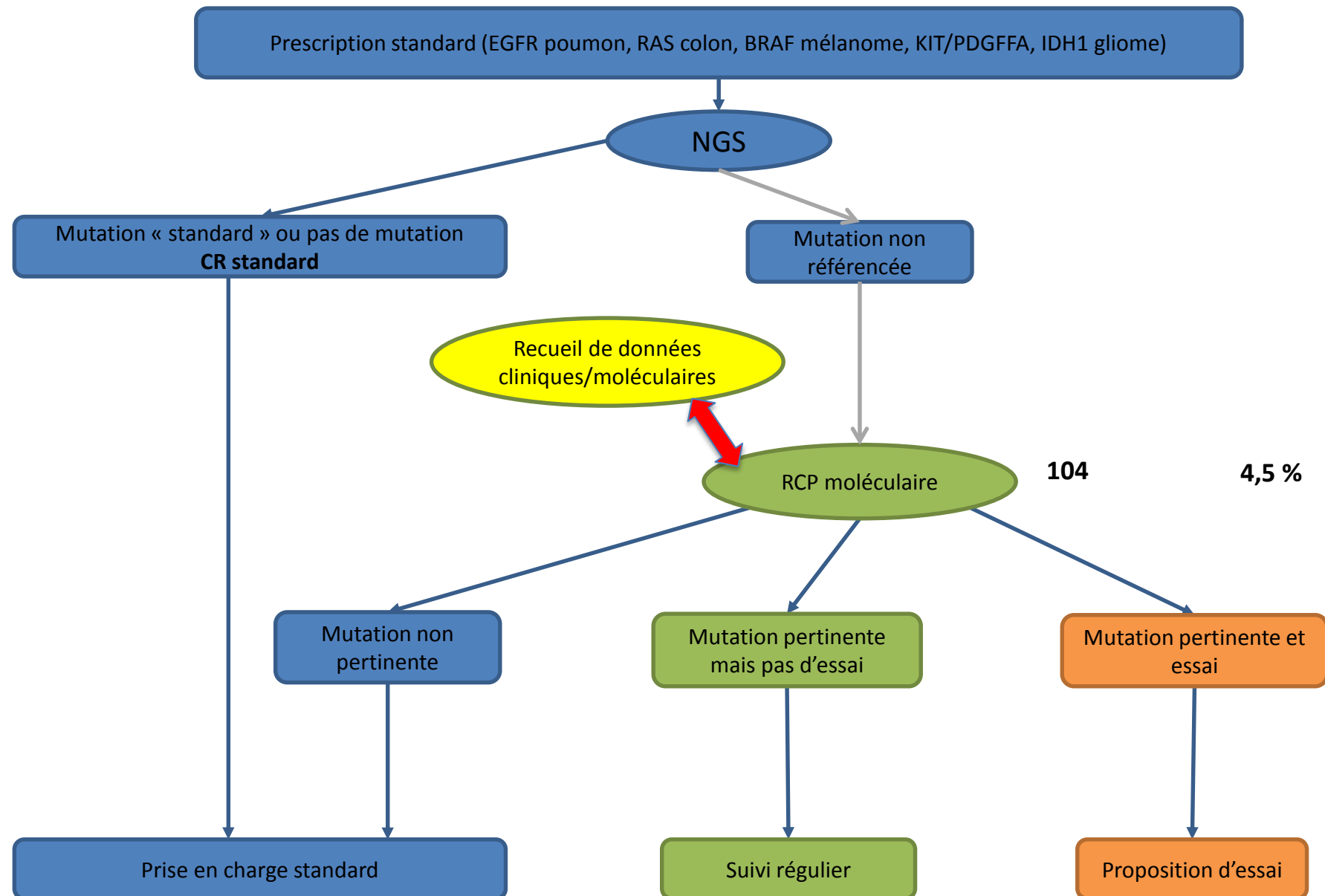
Patients porteurs de mutations hors AMM et ATU est discutés

Essais cliniques

Inclusion dans basket AcSe via NGS

Essais précoces : AO CLIP² (Centres labellisés INCa de phase précoce)

RCP MOLECULAIRE : Fonctionnement - bilan 2015



RCP moléculaire : bilan au 1^{er} janvier 2016

IDH1	AUTRES MUTATIONS	TYPE HISTOLOGIQUE	DECISION - RCP1
WT	IDH2_ Exon 4_c.514A>T	oligoastrocytome anaplasique	CR classique
WT	ERBB4_ Exon10_c.1128C>A_p.D376E_AF_44%	probable meningiome anaplasique	à progression
WT	KRAS_ Exon 2_c.35G>A	glioblastome	CR classique
p.R132H	PIK3CA_ Exon21_c.3140A>G_p.H1047R_AF_46%	glioblastome secondaire	non
WT	IDH2_ Exon 4_c.515G>A	glioblastome	discuter anti-idh1
WT	BRAF_ Exon 15_c.1799T>A_p.V600E_(AF 18,4%)	Gliome	Discuter → acse-vemu
WT	IDH2_ Exon 4_c.515G>A_p.R172K_(AF 37,8%)		non
WT	PDGFRA_ Exon18_c.2537A>C_p.D846A_AF_73%	gliome malin	enregistrement
WT	PDGFRA_ Exon18_c.2538T>A_p.D846E_AF_87%	glioblastome	à progression biblio pour TKI à large spectre
WT	BRAF_ Exon15_c.1799T>A_p.V600E_AF_43%	gliome de haut grade	à progression dabrafenib
WT	BRAF_ Exon 15_c.1799T>A_p.V600E_19%	gangliogliome vs astrocytome pilocytique	CR classique
WT	NRAS_ Exon2_c.34G>T_p.G12C_AF_45%	PNET	à progression anti-MEK
WT	NRAS_ Exon2_c.37G>C_p.G13R_AF_41%	gliome mixte	enregistrement
p.R132H	WT	19 gliomes	CR classique

Nb de patients discutés : 27 patients

2 GBM-BRAF V600 -> AcSe, Dabrafenib,

IDH1 : 19 Gliomes (essai clinique en cours, non discuté)

IDH2 : 3 Gliomes → Daignostic

KRAS : 1 Gliome KRAS Exon 2_c.35G>A

1/27 Patients inclus ds essais cliniques : AcSe Crizo, Poumon

8 Patients potentiellement incluables à la progression

Evolution panel :

Gliome :

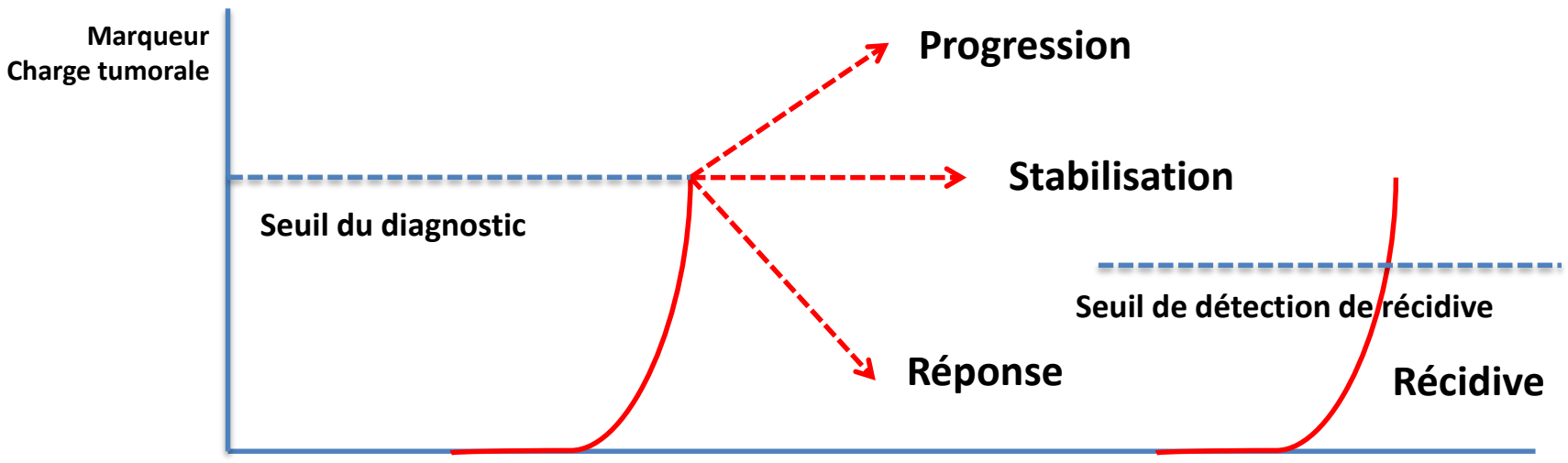
TERTp (P,S), *EGFRvIII* (T?), H3F3A (P), FGFR1,3 (T?)

Suivi des patients sur biopie liquide? ADNtc libre

Intérêt pour les gliomes? : IDH + TRETp + H3K27M + BRAF :

→ 80% des patients avec 1 altération génétique

Conclusion : NGS & biomarqueurs génétiques moléculaires



risque
Gènes de prédisposition

Stratégie thérapeutique
Pronostic
Et suivi

Récidive
Mutation somatique
Résistance

BRCA

Diagnostic :

Panel de gènes PG
(MMR, P53, NF1...)
Sang

Panel de gènes D, P ou T
(IDH, TERTp...)
FFPE>plasma

Panel de gènes
Plasma, LCR : fct-DNA

Transfert :

..... Exome RNAseq WGS

MERCI!



**Service de Génétique Moléculaire et Génomique
TONG, UMR6290 CNRS, UR1**

Plate-forme INCa

BM Alexandra Lespagnol

Cécile Chaplais

Helena Gourdet

Frédérique Guénot

Gaëlle Moron

BI Marie de Tayrac

Amyra Aliouat

Florent Denoual

B Annick Mosser

Marie-Pascale Beaumont

Marie-Dominique Galibert

Houda Hamdi

Marie de Tayrac

**Plate-forme Génomique environnementale & humaine
UR1, Biogenouest, IBISA**

Marc Aubry



Direction des systèmes d'information du CHU de Rennes

Christine Pichon

Denis Courtel

Arnauld Coursin

NeuroOncologie

Elodie Vauléon

**RCP Moléculaire bretonne
(Julien Edeline & JM)**

génétiiciens

dermatologues

gastro-entérologues

gynécologues

pathologistes

pneumologues

neuro-oncologues

neuro-pédiatres...

Pole régional de cancérologie

