

**laboratoire de biologie spécialisée et
oncogénétique
Pierre-Jean Lamy**



**Evolutions de la biologie clinique pour
la prise en charge des cancers
*de l'oncogénétique à la biopsie liquide***





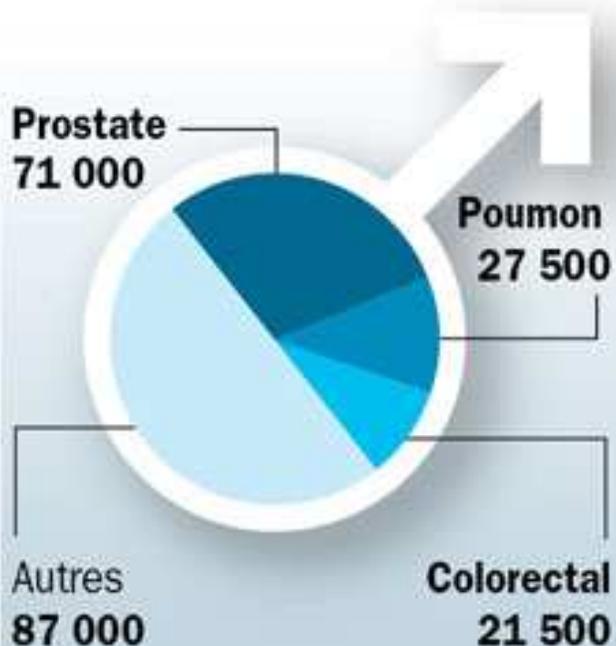
1 000 nouveaux cas de cancer par jour en 2011

Estimations de l'Institut national du cancer

Chez l'homme

207 000

nouveaux cas

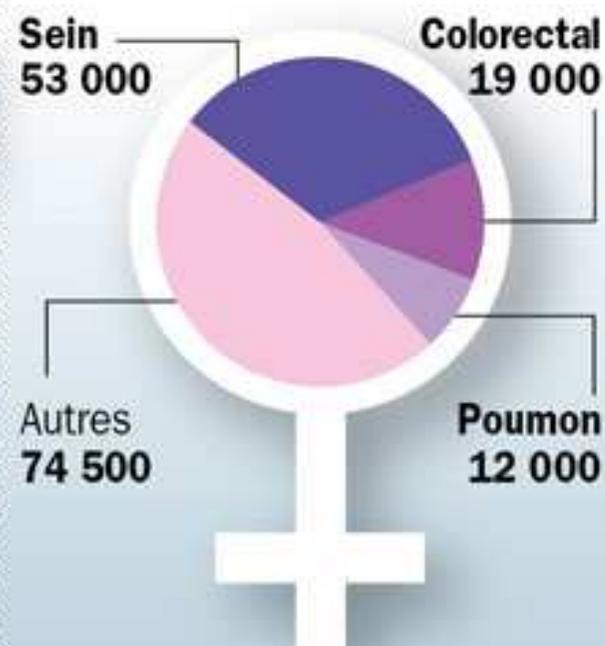


84 500 décès

Chez la femme

158 000

nouveaux cas



63 000 décès

Source : INCa - chiffres 2011





Le cancer : une maladie de l'ADN



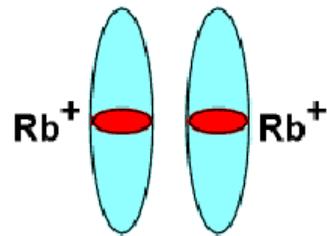
- **ADN** : siège d'altérations successives
 - modification de l'information génétique
 - altération des mécanismes de division, maturation, et différenciation cellulaire
- **Causes** :
 - les carcinogènes sont des mutagènes
 - les transformations virales : les proto-oncogènes
 - anomalies transmissibles lors de la division cellulaire
- **Conséquences : caractères tumoraux des cellules transformées**
 - altérations génotypiques
 - modifications phénotypiques : effecteurs



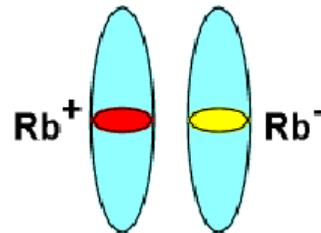
Un modèle de cancer héréditaire



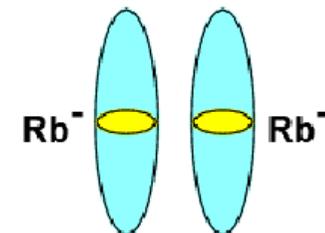
Le rétinoblastome



Cellules somatiques
Individu normal
Deux allèles 'sauvages'

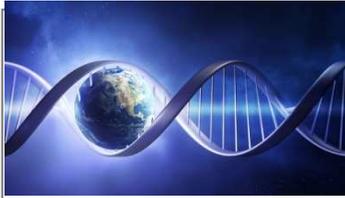


Cellules somatiques
Rétinoblastome
Un allèle 'sauvage'
Un allèle muté



Cellules malignes
Rétinoblastome
Deux allèles mutés

Une mutation germinale + une mutation acquise
= cancer



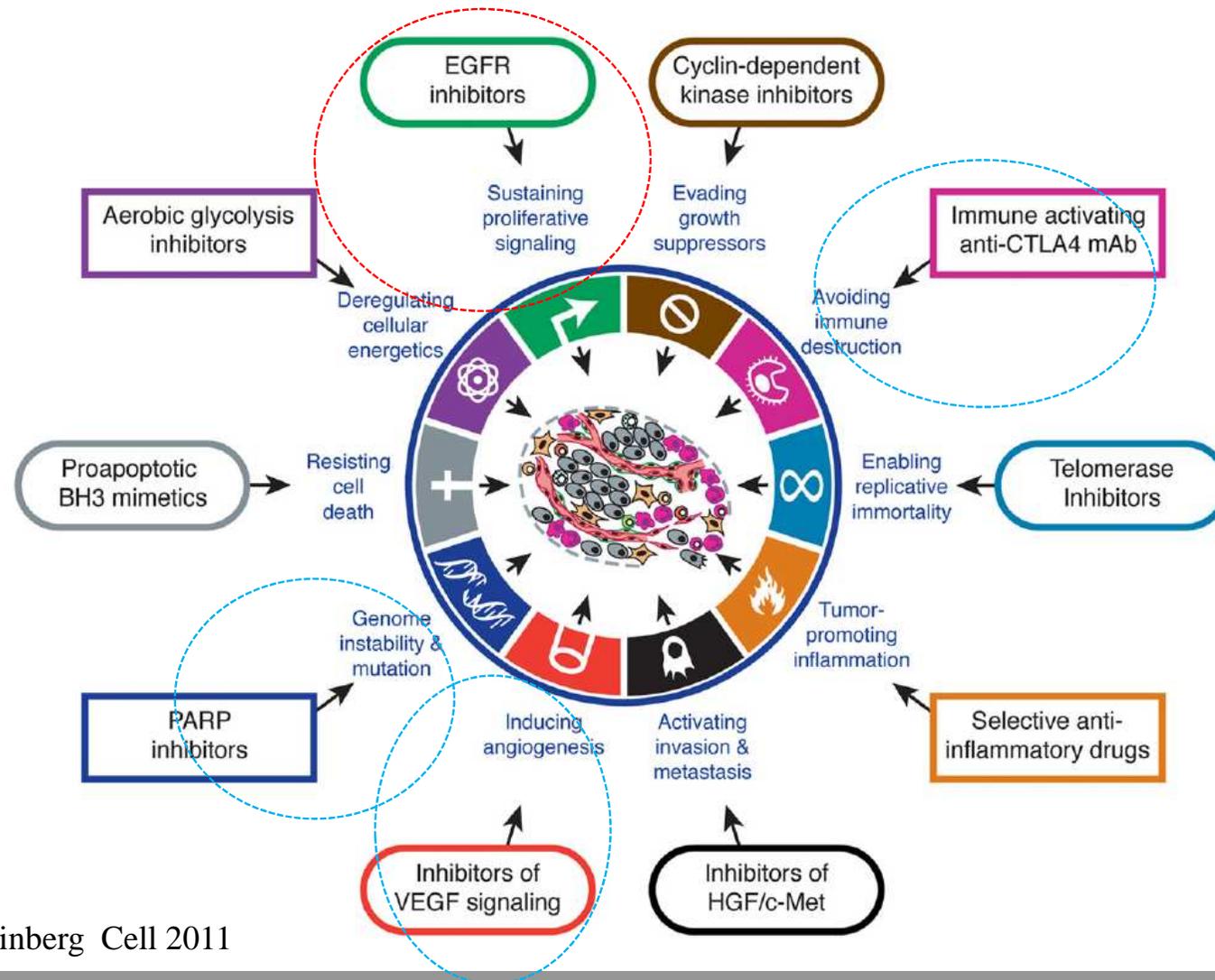
95 % des cancers ne sont pas héréditaires

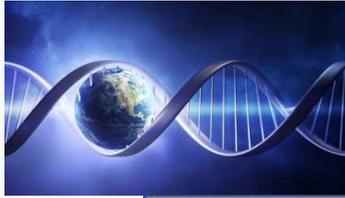


- Anomalies dites somatiques (lignées germinales non atteintes) acquises
- Des anomalies génétiques concernent les gènes codant des protéines de régulation de la croissance cellulaire, de la prolifération de l'apoptose etc...
- Ces gènes sont :
 - soit des "**oncogènes**" ce qui aboutit à une protéine hyperactive ou surexprimée => **GAIN DE FONCTION**
 - soit des "**gènes suppresseurs**" ce qui aboutit à une protéine inactive ou absente => **PERTE DE FONCTION**

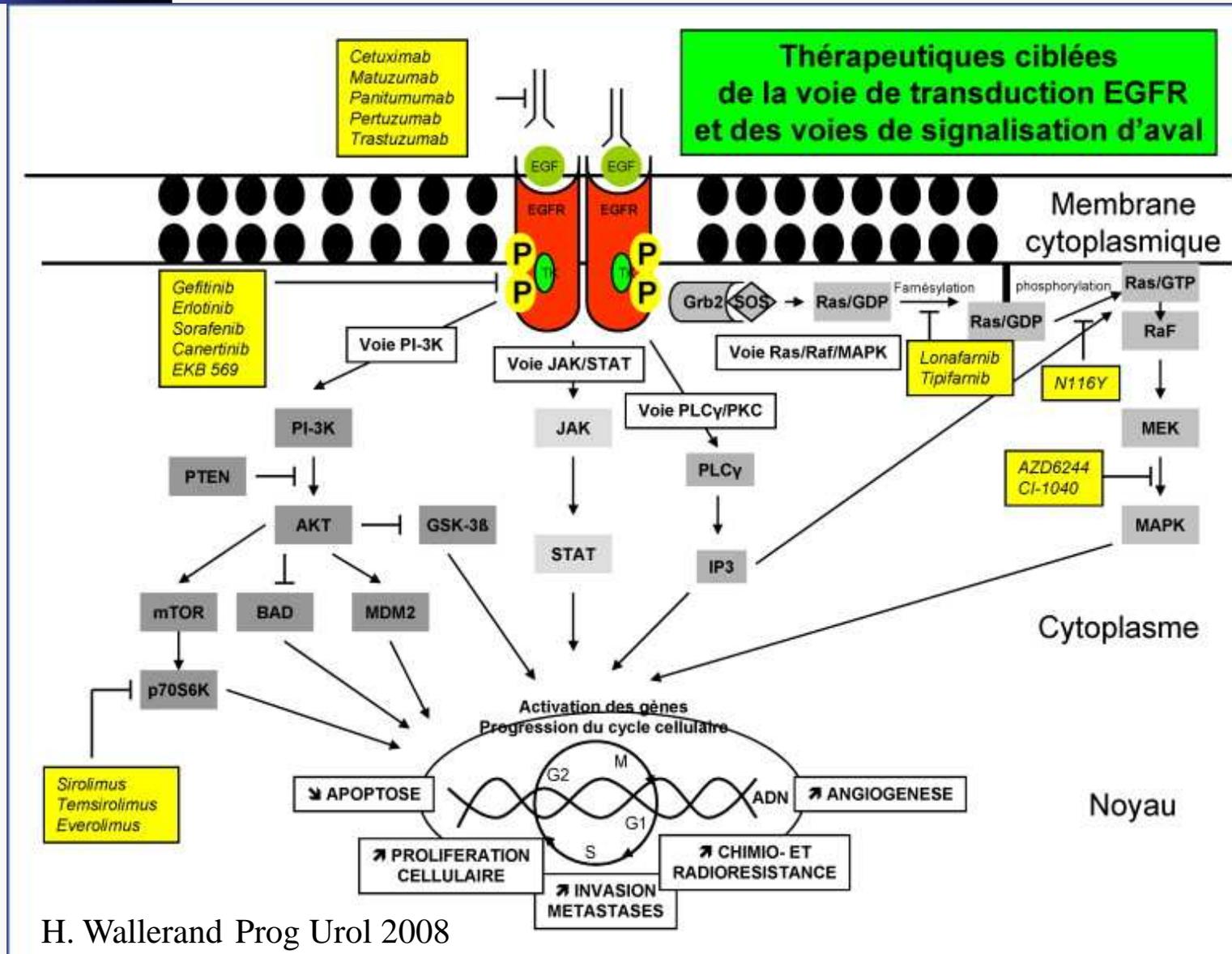


Les 10 propriétés de la cellule cancéreuse





Anomalies tumorales et traitement : concept thérapies ciblées





Oncogénétique ou génétique des cellules cancéreuses

L'identification d'altérations génétiques au sein des cellules cancéreuses a permis la mise en évidence de nouveaux biomarqueurs moléculaires.

3 clés

- Révolution technologique = Séquençage du génome humain
- Nouveau Concept = Thérapie ciblée (sur la cellule cancéreuse)
- Nouvelle biologie = Biomarqueurs compagnons (du traitement)



Oncogénétique ou génétique des cellules cancéreuses

Le Glivec (imatinib)

-1960 University of Pennsylvania : 1 anomalie chromosomique (Chr Phi) est présente dans les cellules de LMC

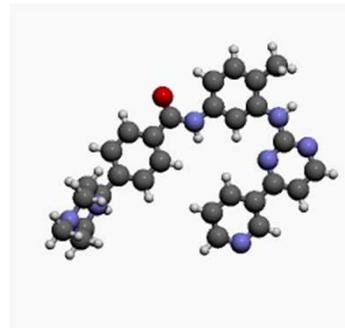
-1986 University of Chicago : L'anomalie chromosomique produit une enzyme (kinase) qui est la cause de la prolifération cellulaire

-1990 Dr. Elisabeth Buchdunger and Dr. Juerg Zimmerman (Ciba-Geigy) ciblent la kinase Phi sans altérer les kinases normales

-1992 synthèse du STI-571 – 1998 : essai de phase I : pétition des patients sur internet (Suzan Mc Namara)

-2001 : AMM pour les LMC,

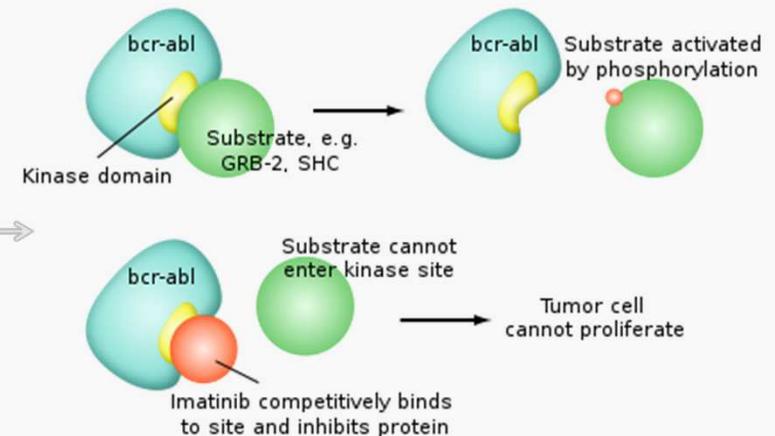
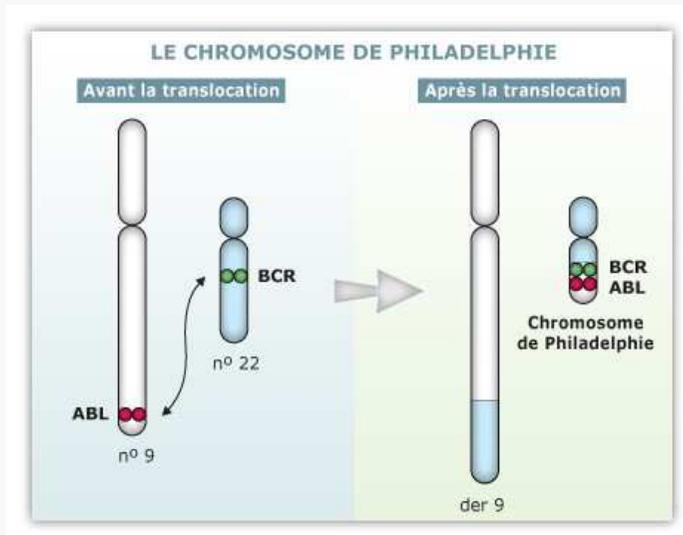
-2002 : AMM pour les GIST





Oncogénétique ou génétique des cellules cancéreuses

Le Glivec (imatinib)



1 anomalie

1 traitement

médecine personnalisée

Oncogénétique des tumeurs solides



L'EXEMPLE DU CANCER MAMMAIRE



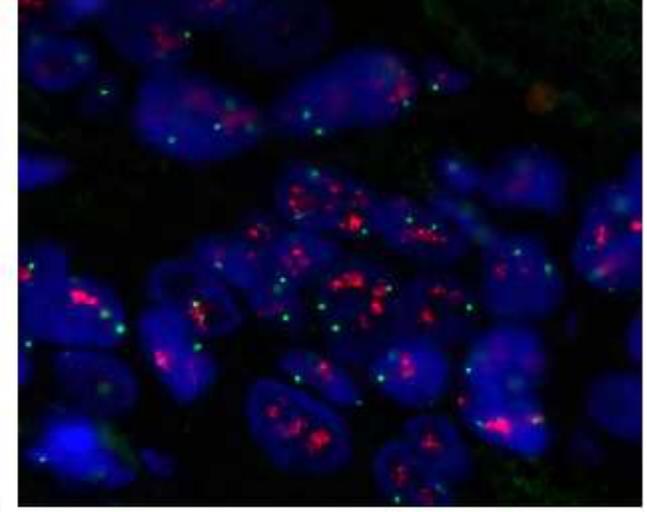
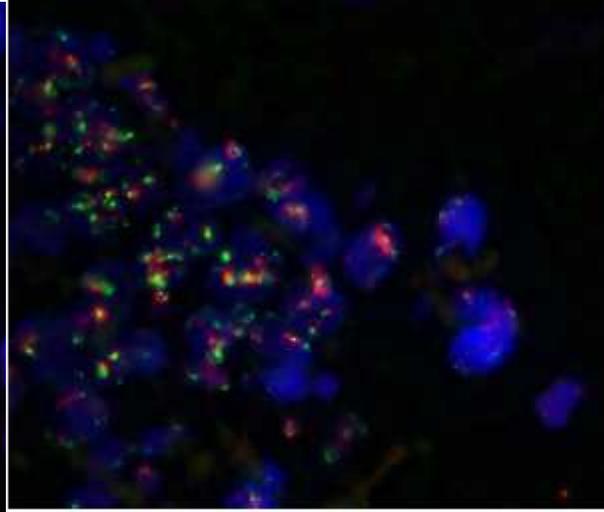
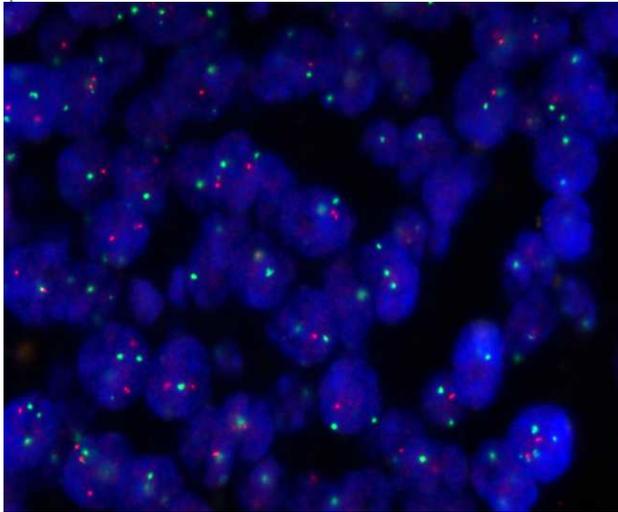
Une anomalie moléculaire du Chr 17



I

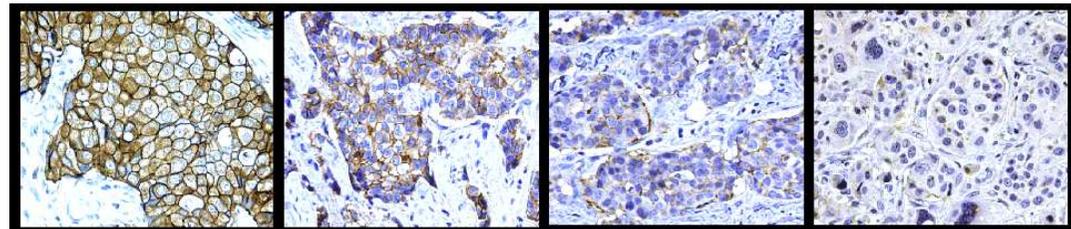
II

III



centromeric probe of chromosome 17 (green)
HER2/ERBB2 probe (red)

I : HER 2 Non amplifié
II : Polysomie
III : HER2 amplifié



3+

2+

1+

0



EGF
TGF- α
Beta celluline
Heparine-binding
Growth Factor
Amphiréguline
Epiréguline...

HER2 : glycoprotéine de 185 kD
Pas de Ligand
Formation d'hétérodimères



HER 1 : rEGF

HER2

HER3

HER4

Activité tyrosine kinase

Voies de signalisations

Prolifération cellulaire, survie
Cancérogenèse mammaire

Croissance des épithéliums
Protection des cardiomyocytes

Famille des récepteurs de type 1 des FC



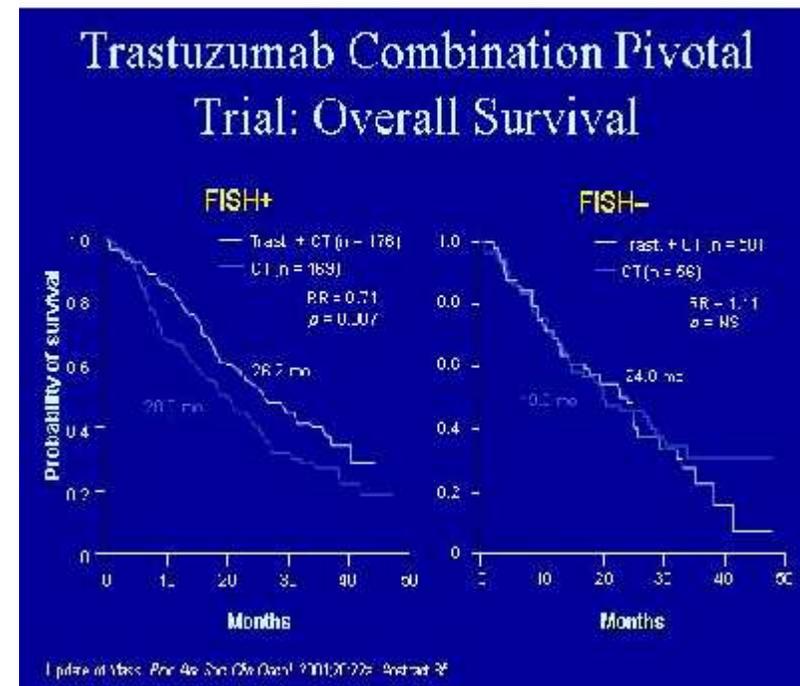
HER2 : Facteur Prédicatif de la Réponse



Essai HERA

1 traitement trastuzumab
(herceptinetm) : IgG monoclonale
murine humanisée anti-her2

Efficace uniquement sur les
cancers sur-exprimant la
cible



Oncogénétique des tumeurs solides



L'EXEMPLE DU MÉLANOME





Mélanomes : stade et survie

≈ 80 % des diagnostics



Survie à 5 ans
> à 80 %

Stades I et II

≈ 20% des cas diagnostiqués aux stades III et IV

Survies à 5 ans très hétérogènes



13 % à 69 %

Stade III

Survie médiane sous chimiothérapie : 6,2 mois

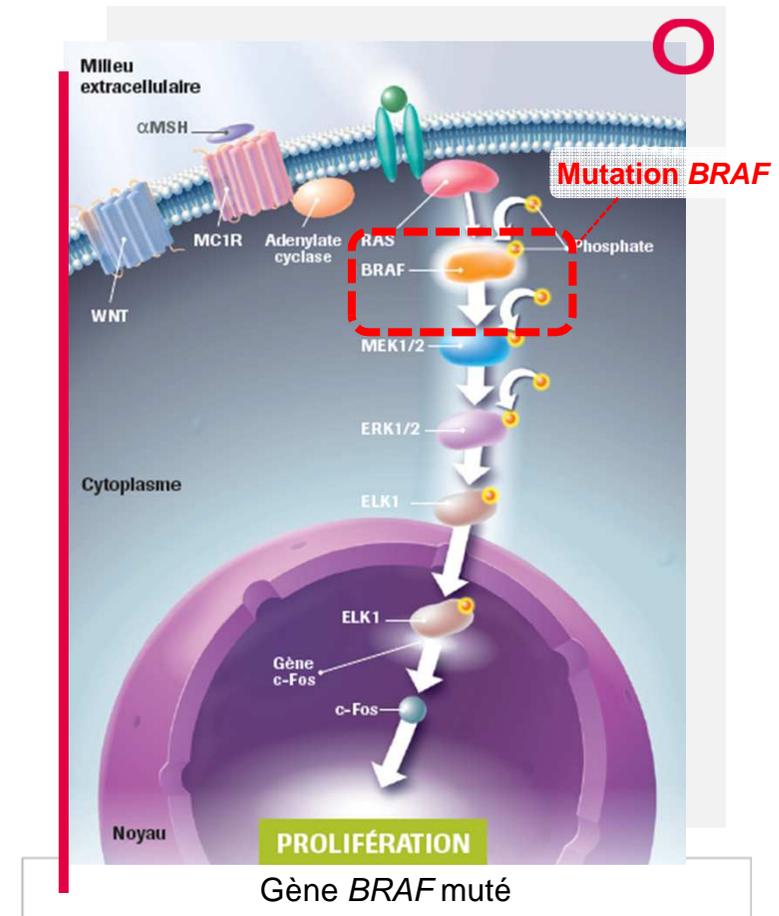


Une mutation fréquente

40 à 60% des mélanomes

Impacts de la mutation *BRAF*

- Blocage de la protéine BRAF en forme active, ce qui implique :
- ➔ Une augmentation de la prolifération cellulaire





Zelboraf® cible spécifiquement la protéine BRAF mutée

Mutation du gène *BRAF*⁽¹⁾

Activation constitutive des protéines *BRAF*⁽¹⁾

Prolifération cellulaire en l'absence des facteurs de croissance normalement requis pour la prolifération⁽¹⁾

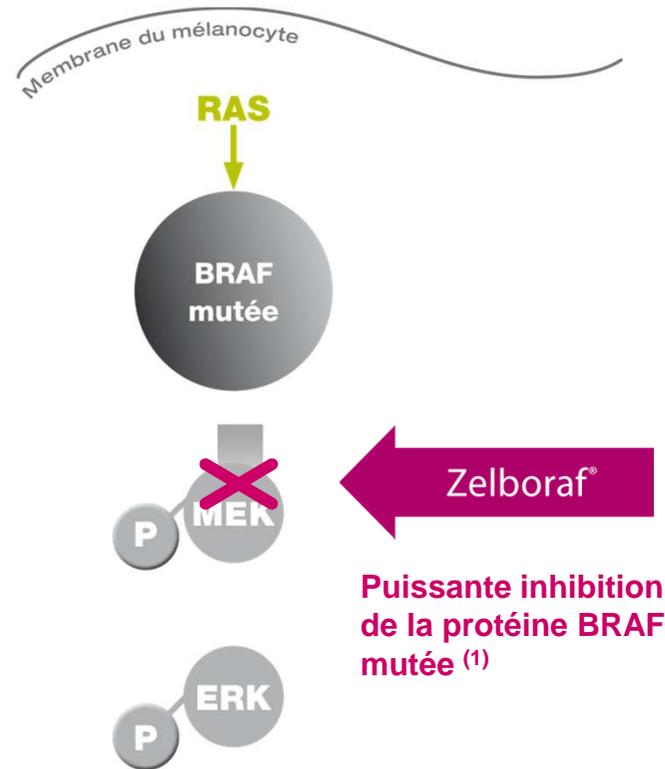
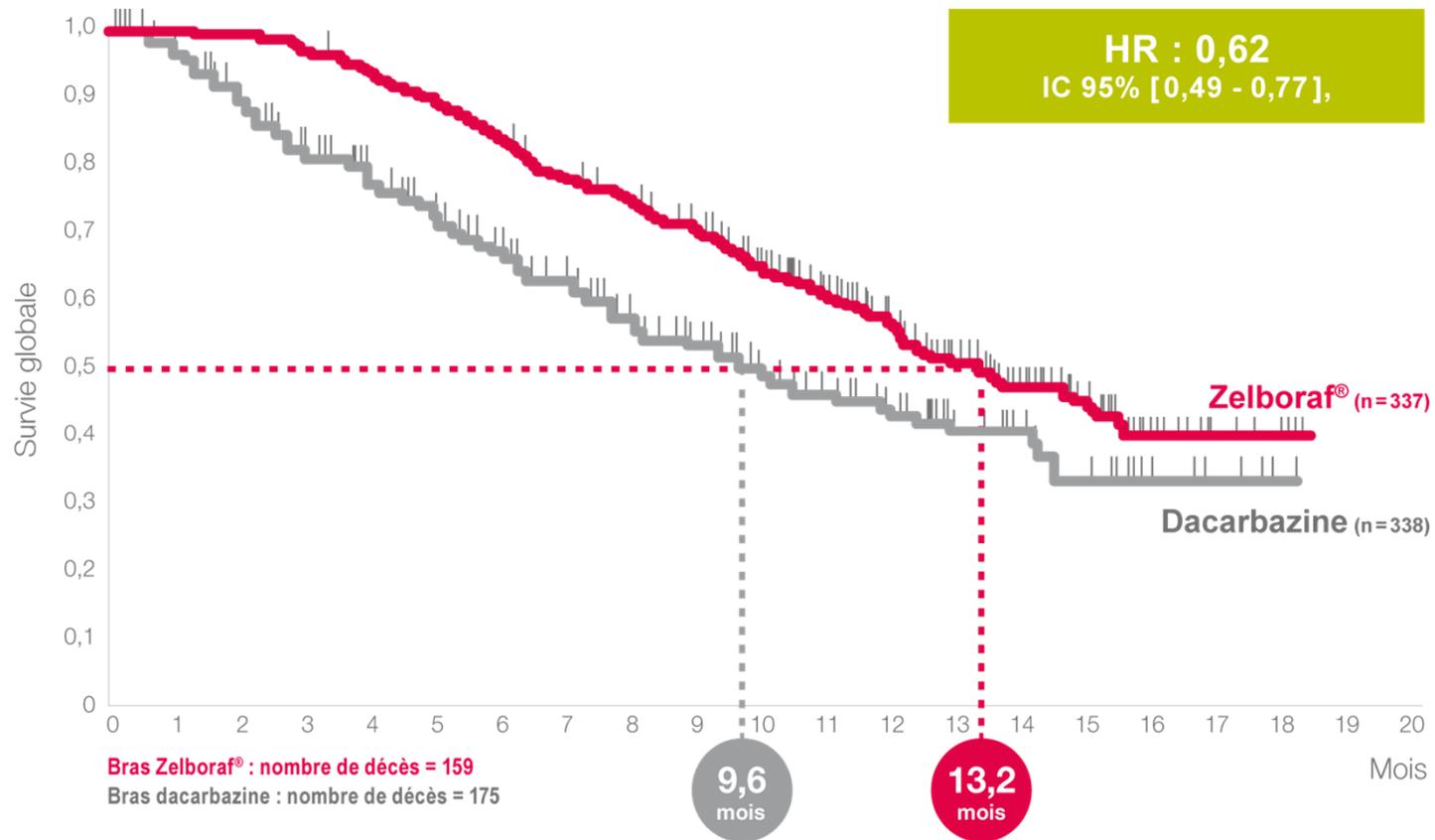


Schéma d'après Wellbrock C *et al*



BRIM 3
Essai en 1^{ère} ligne métastatique

Survie globale





Mutations BRAF



- Exon 15 : CTACAG₁₇₉₈T₁₇₉₉G₁₈₀₀AAAT



- BRAF c.1798G>A pV600M (methionne) S
- BRAF c.1798_1799GT>AA pV600K (Lysine) S
- BRAF c.1798_1799GT>AG pV600R (Arginine) S
- BRAF c.1799_1800TG>AA pV600E (glutamine) **S**
- BRAF c.1799T>G pV600G (Glycine) ?
- BRAF c.1799_1800TG>AT pV600D (ac aspartique) S

S : Données cliniques S : Données pré-cliniques

Yang H. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. Cancer Res. 2010 Jul 1;70(13):5518-27.

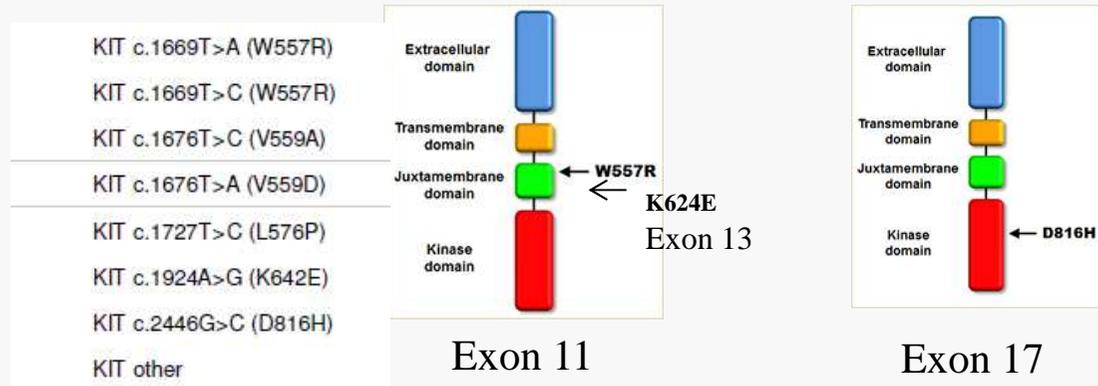


Autres statuts mutationnels des mélanomes

	Arising from Skin Without Chronic Sun Damage	→	~50% BRAF ~20% NRAS
	Arising from Skin With Chronic Sun Damage	→	~10% BRAF ~10% NRAS ~2% KIT
	Arising from Mucosal Surfaces	→	~5% BRAF ~15% NRAS ~20% KIT
	Arising from Acral Surfaces	→	~15% BRAF ~15% NRAS ~15% KIT
	Uveal Melanoma	→	~32% GNA11 ~50% GNAQ <1% BRAF

- Guanine nucleotide binding proteins (G proteins)
GNA11-GNAQ : mélanome uvéal
- CTNNB1 (beta-catenin) – exposition solaire

Mutations de Kit :



Mutations de NRAS

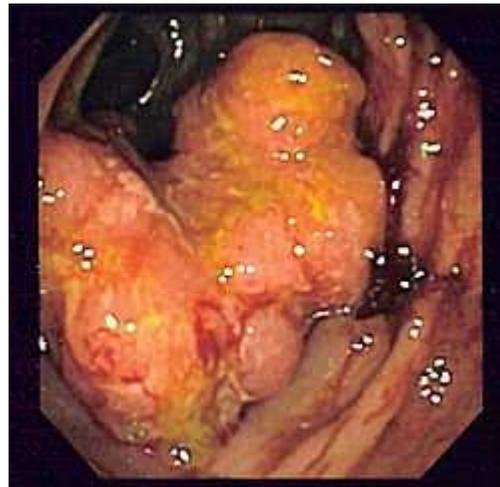
NRAS c.181C>G (Q61E)	NRAS c.34G>T (G12C)
NRAS c.181C>A (Q61K)	NRAS c.34G>C (G12R)
NRAS c.182A>T (Q61L)	NRAS c.34G>A (G12S)
NRAS c.182A>C (Q61P)	NRAS c.35G>C (G12A)
NRAS c.182A>G (Q61R)	NRAS c.35G>A (G12D)
NRAS c.182_183AA>TG (Q61L)	NRAS c.35G>T (G12V)
NRAS c.182_183AA>GG (Q61R)	NRAS c.37G>T (G13R)
NRAS c.183A>C (Q61H)	NRAS c.38G>C (G13A)
NRAS c.183A>T (Q61H)	NRAS c.38G>A (G13D)
	NRAS c.38G>T (G13V)

Enhanced tumor growth in melanoma cells harboring mutant RAS (Hatzivassiliou et al. 2010; Poulikakos et al. 2010).

Oncogénétique des tumeurs solides

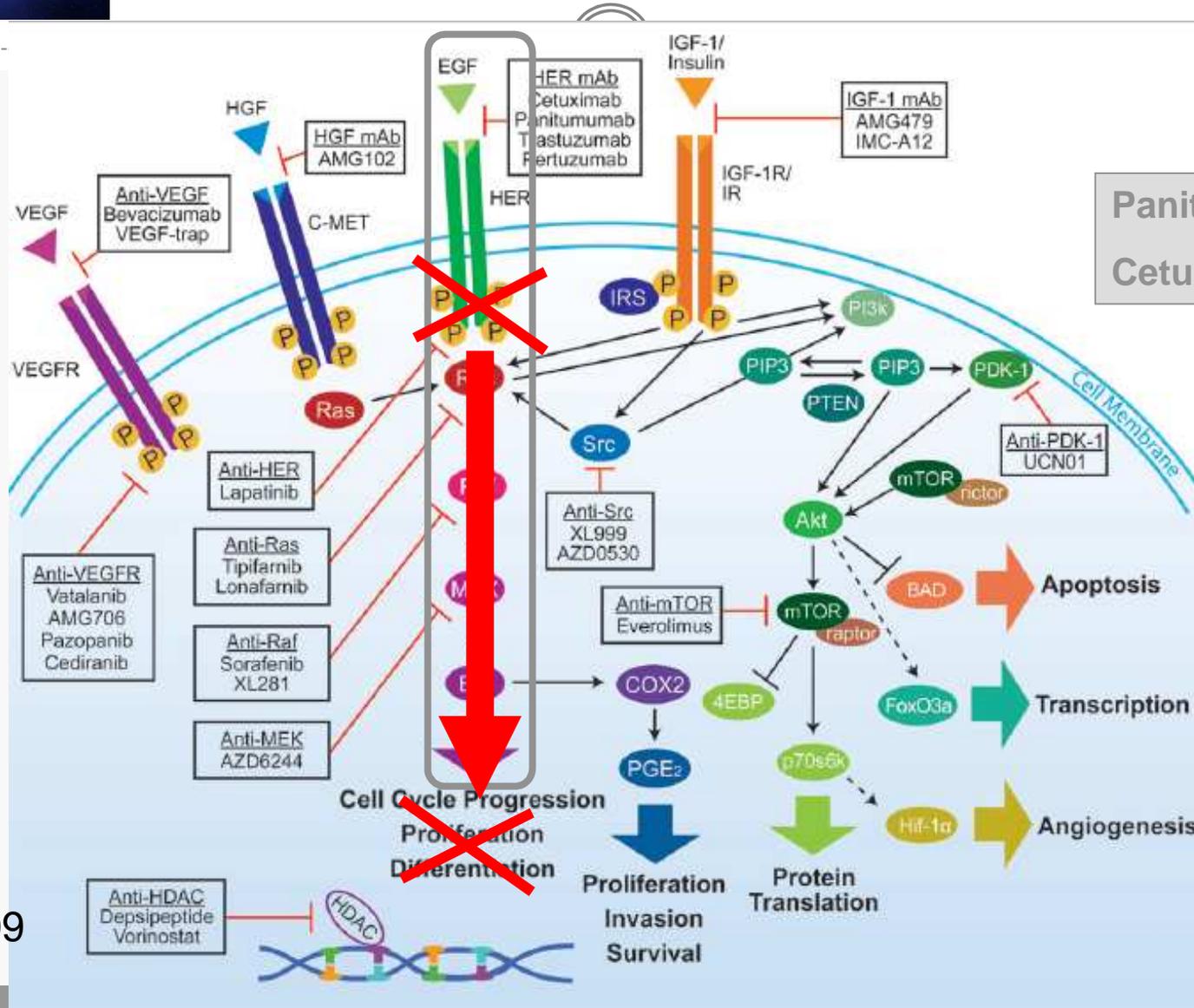


L'EXEMPLE DU CANCER COLO-RECTAL

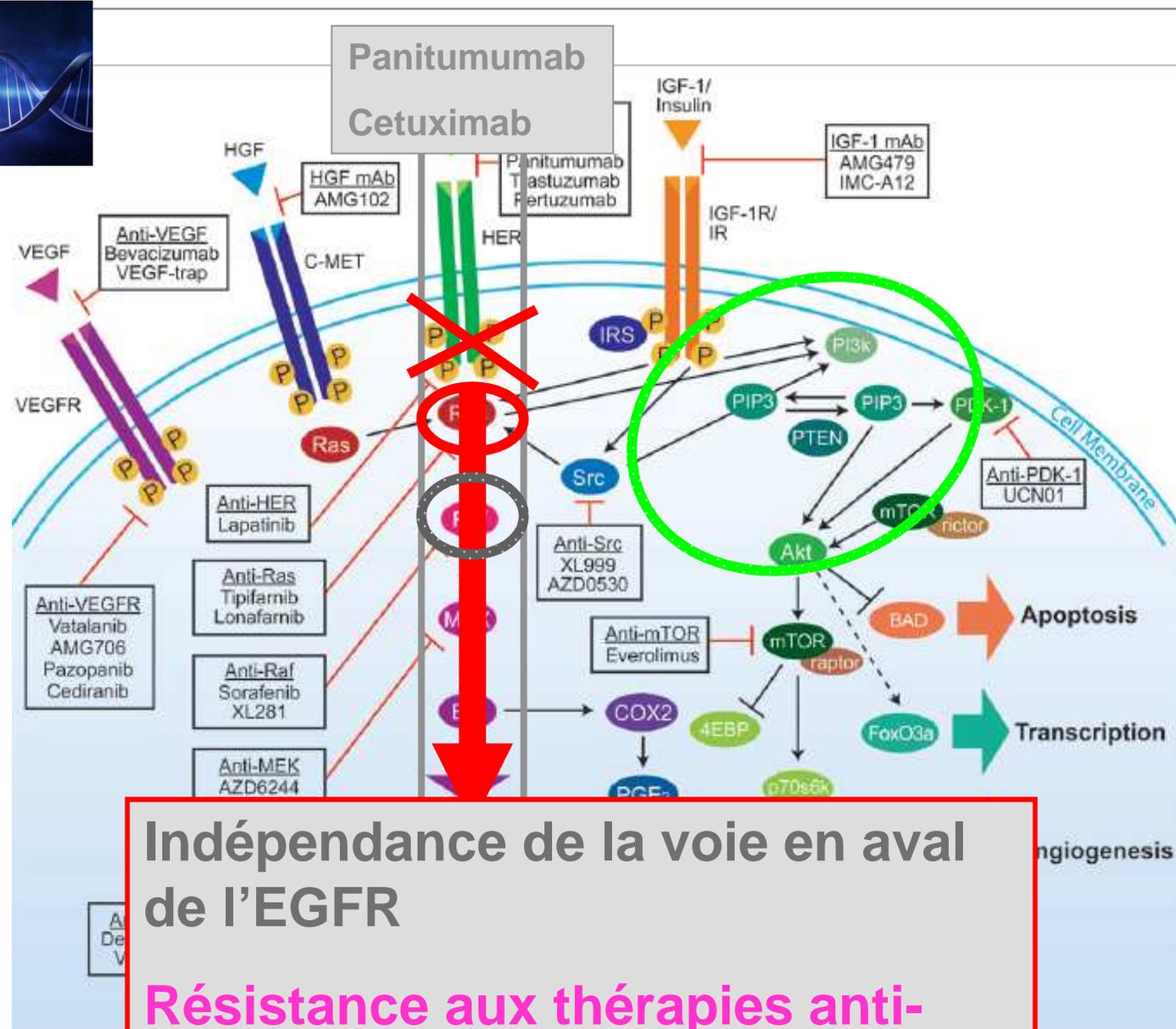




EGFR une cible dans le CRC



JNCI 2009



Indépendance de la voie en aval
de l'EGFR

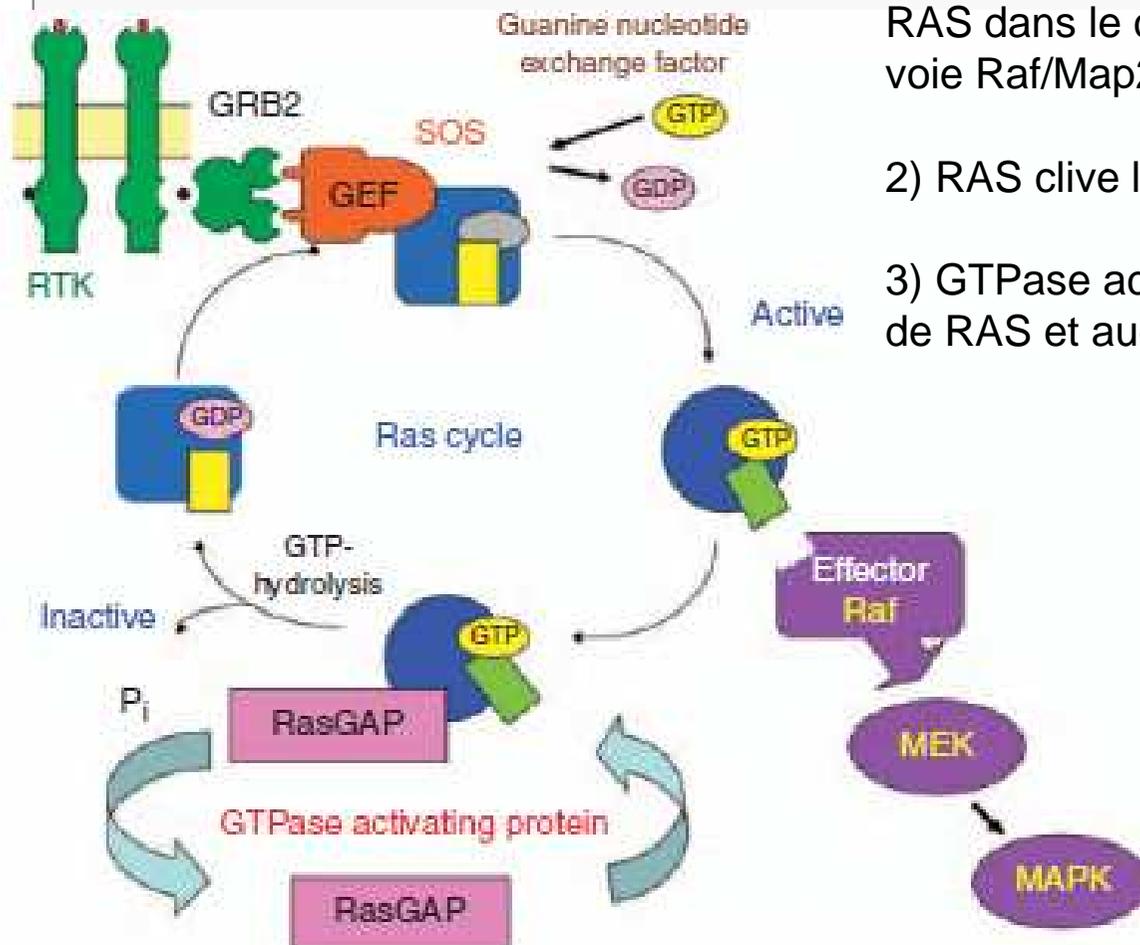
Résistance aux thérapies anti-
EGFR



(*Ki-ras*) KRAS



Smith et al. BJC 2010



1) Guanosyl nucléotide exchange factor (GEF) libère RAS dans le cytoplasme. Il fixe la GTP et active la voie Raf/Map2kK 1 et 2

2) RAS clive la GTP en GDP : auto-inactivation

3) GTPase activating protein (GAP) : action sur GDP de RAS et augmentation de l'activité

Mutation de *KRAS*

-*Kras* activée en permanence
-Expression de gènes de prolifération et différenciation: *MYC*, *CREB*, Nuclear Factor B...

Mutations de KRAS et réponse aux anti-EGFR

Priority Report

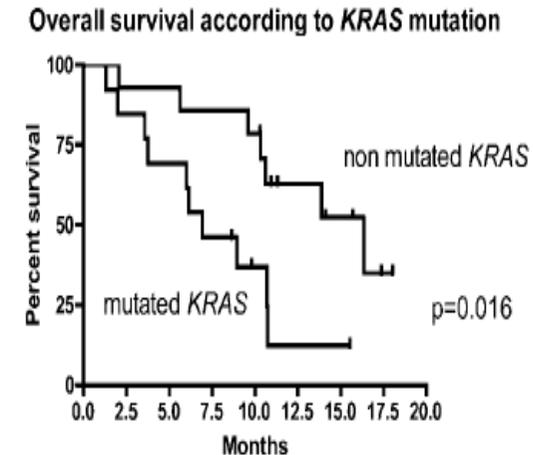
Cancer Res 2006

KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer

Astrid Lièvre,^{1,3} Jean-Baptiste Bachet,³ Delphine Le Corre,¹ Valérie Boige,⁴ Bruno Landi,²
Jean-François Emile,³ Jean-François Côté,^{1,2} Gorana Tomasic,⁴ Christophe Penna,³
Michel Ducreux,⁴ Philippe Rougier,³ Frédérique Penault-Llorca,⁵ and Pierre Laurent-Puig^{1,2}

30 patients cetuximab+irinotecan ou Folfiri
-13 mutés (43%) = 0% réponse

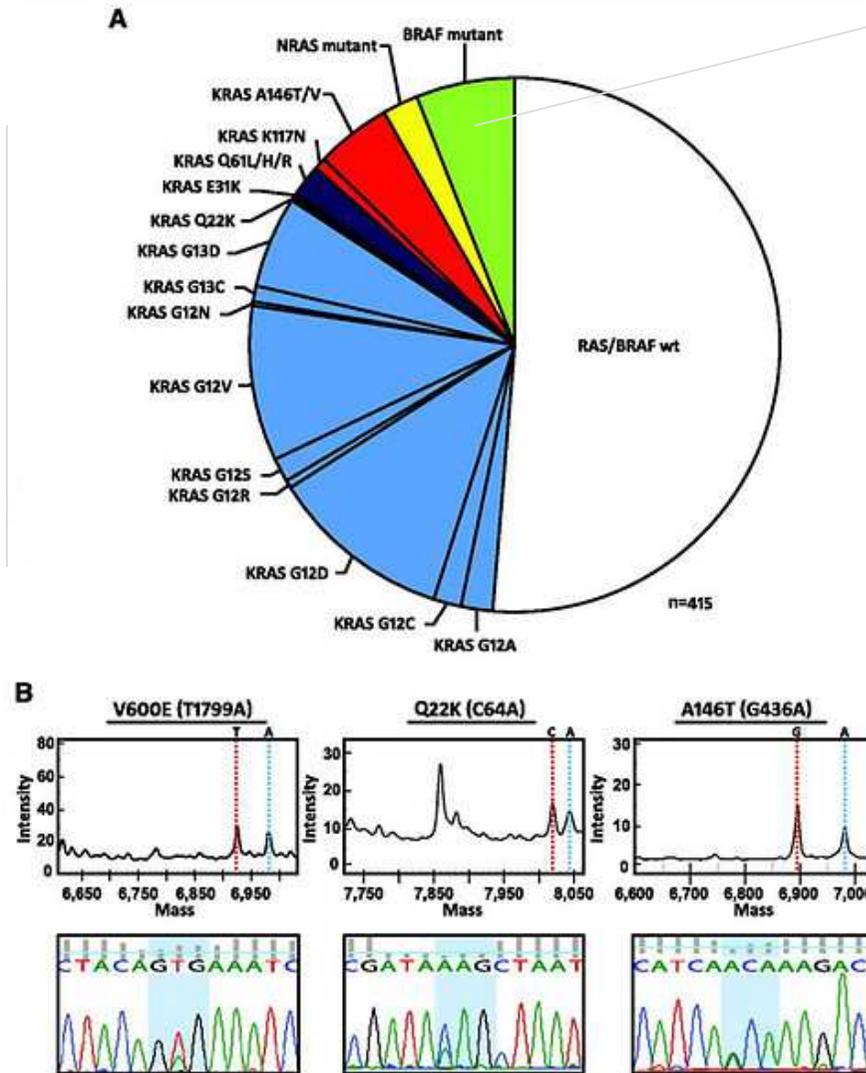
-médiane de survie Kras Mutés = 6,9 mois
Contre 13,6 Kras sauvage



Les super wild-type!

Mutation de Braf
Mauvais pronostic

Mutations de KRAS et NRAS
Résistance aux anti-EGFR

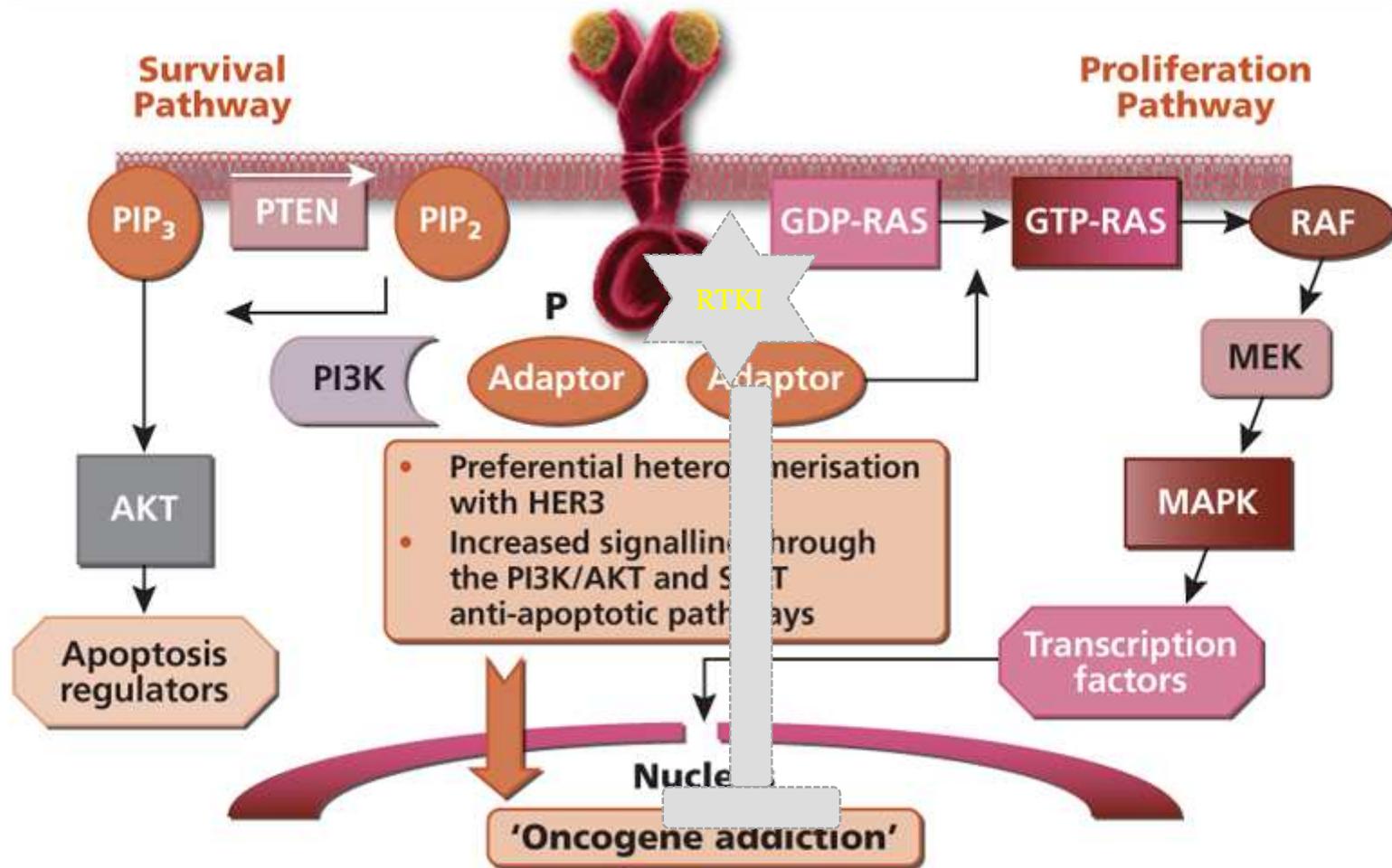


Oncogénétique des tumeurs solides

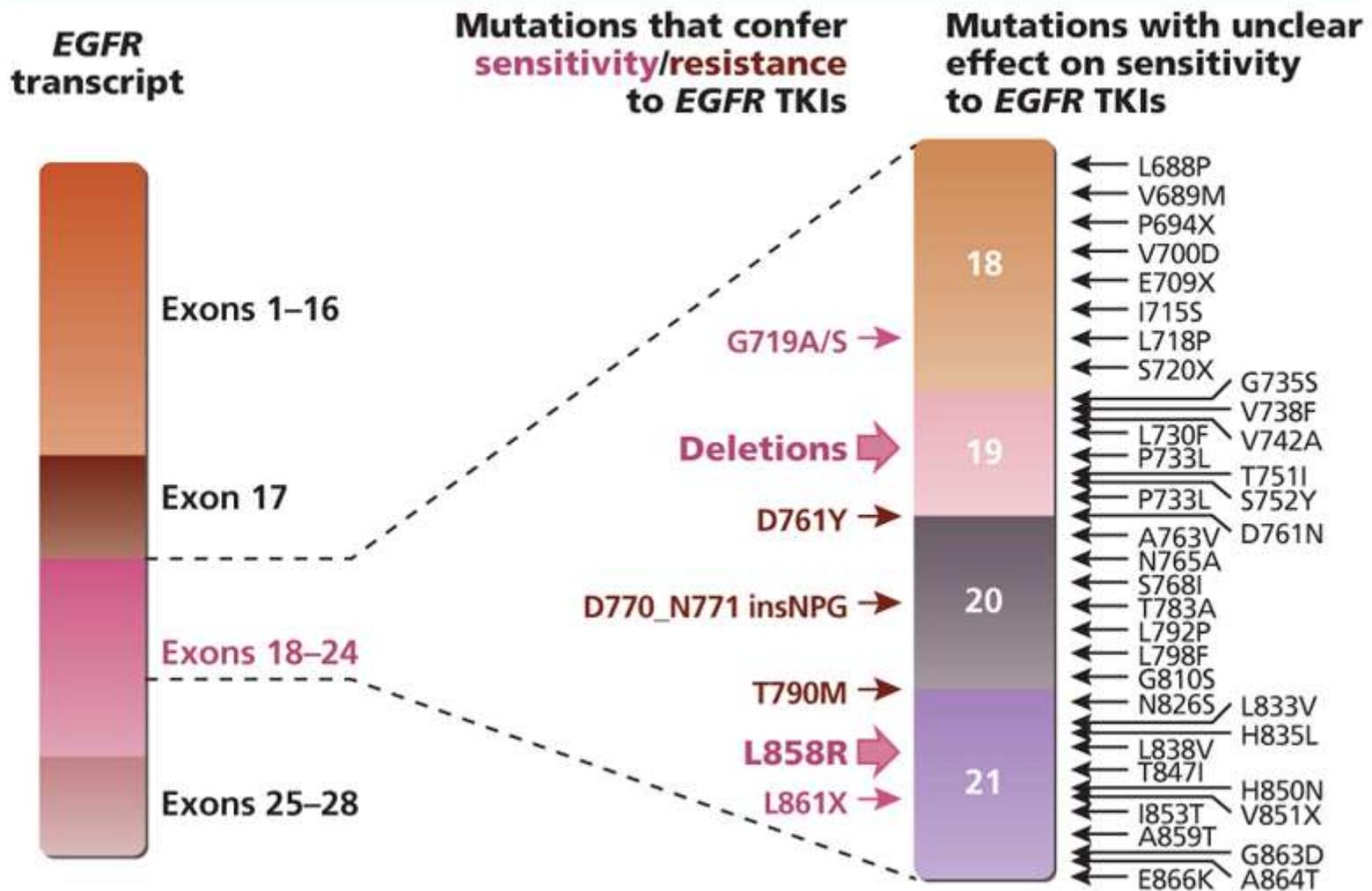


L'EXEMPLE DU CANCER BRONCHIQUE

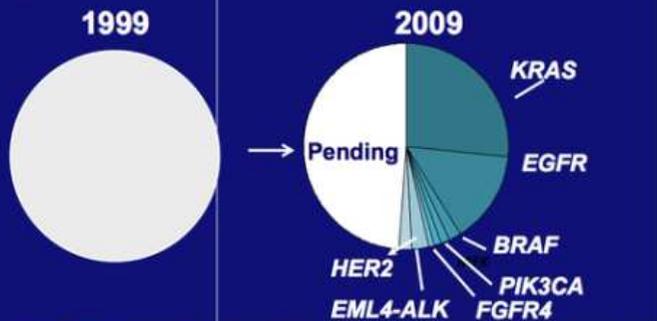
EGFR Activating Mutations: A Distinct Subtype of NSCLC



Mutations Identified in the *EGFR* Gene

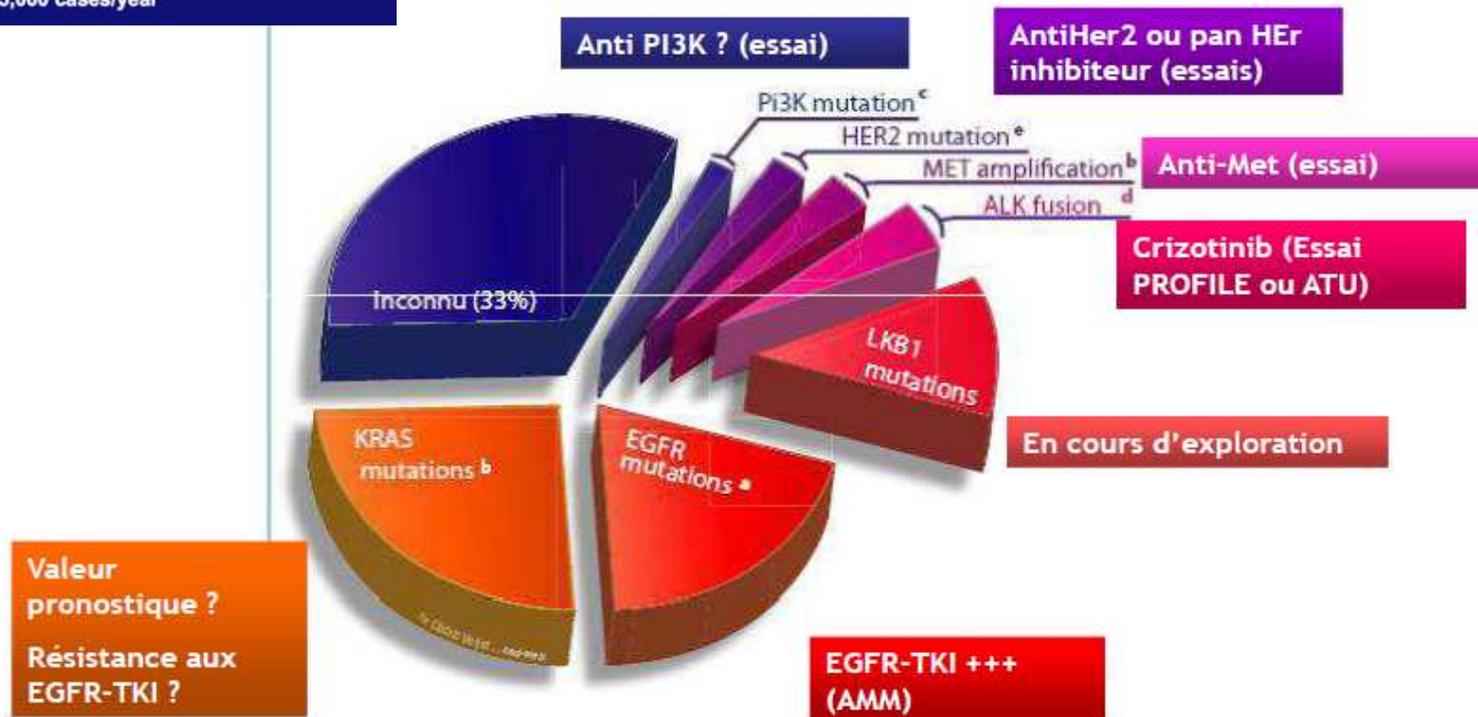


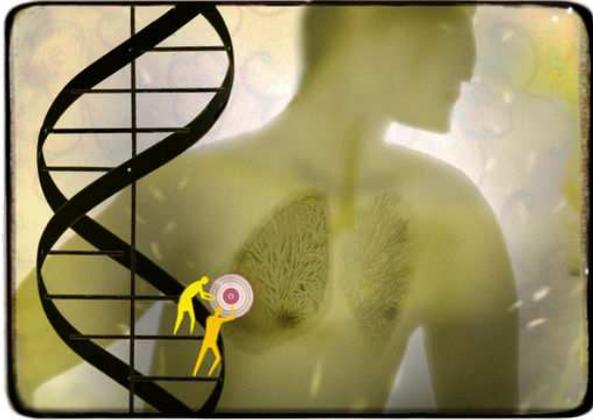
An Evolving View of Adenocarcinoma



Over 50% of NSCLC Tumors have mutations in known oncogenes for which targeted therapies have been developed.
10% of NSCLC patients = 15,000 cases/year

Oncogénétique somatique en oncologie bronchique en 2013

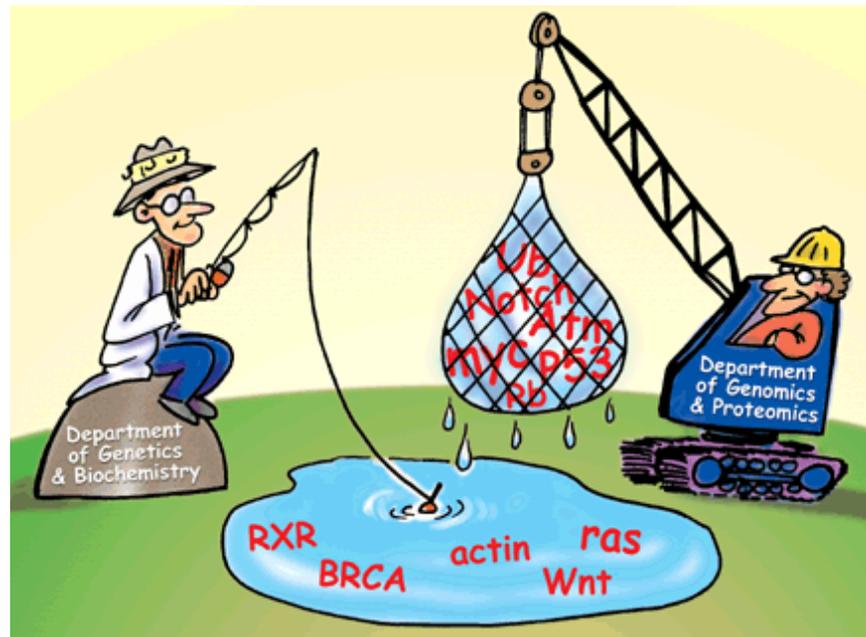




Inca 2006 : Mission des plateformes de génétique moléculaire des cancers

Participer au diagnostic,
en complémentarité de paramètres cliniques,

- orienter le processus diagnostique ;
- déterminer l'accès à une thérapie ciblée ;
- orienter la stratégie de traitement du patient ;
- permettre le suivi de la maladie résiduelle.



28 plateformes d'oncogénétique somatique labellisée INCa

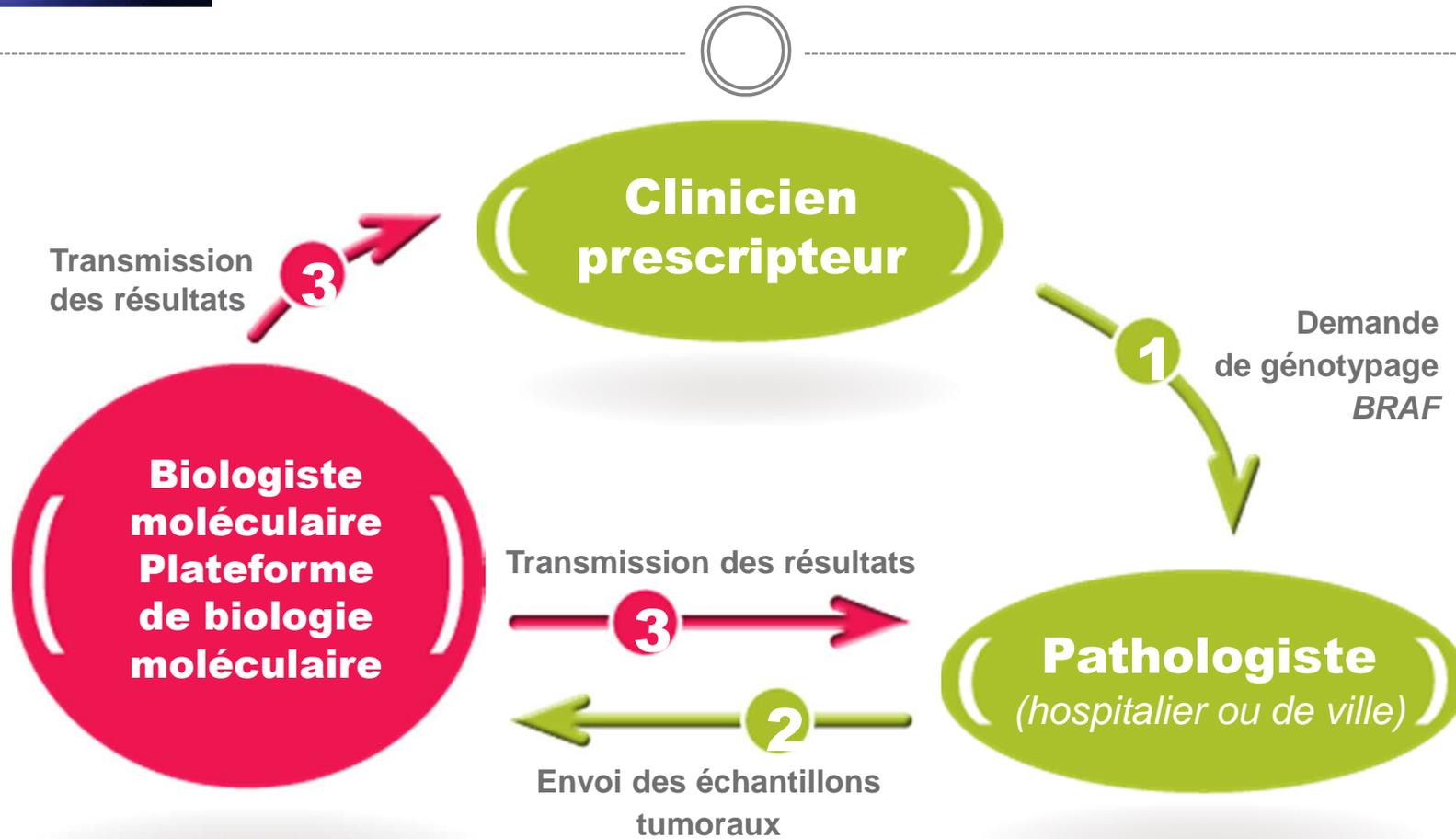
mesure 21 du Plan cancer 2009-2013, « Garantir un égal accès aux traitements et aux innovations ».

Marqueurs prédictifs déterminant l'accès à une thérapie ciblée		
✓ Cancer du sein	Amplification de <i>HER2</i>	<p>Prescription du trastuzumab dans le cancer du sein métastatique et en adjuvant dans le cancer du sein précoce</p> <p>Prescription du pertuzumab en association avec trastuzumab et docetaxel dans le cancer du sein métastatique</p> <p>Prescription du lapatinib dans le cancer du sein métastatique</p>
Cancer gastrique	Amplification de <i>HER2</i>	Prescription du trastuzumab dans le cancer gastrique métastatique
Cancer colorectal métastatique	<p>Mutations de <i>KRAS</i></p> <p>Mutations de <i>BRAF</i>*</p>	Prescription du panitumumab et du cetuximab
GIST (Gastro-Intestinal Stromal Tumor)	<p>Mutation de <i>KIT</i></p> <p>Mutation de <i>PDGFRA</i></p>	<p>Prescription d'imatinib</p> <p>Prescription d'imatinib</p>
Cancer du poumon	<p>Mutations d'<i>EGFR</i></p> <p>Translocations d'<i>ALK</i></p> <p>Mutations de <i>KRAS</i>*</p> <p>Mutations de <i>BRAF</i>*</p> <p>Mutations de <i>PI3KCA</i>*</p> <p>Mutations de <i>HER2</i>*</p>	<p>Prescription du gefitinib, d'erlotinib ou d'afatinib</p> <p>Prescription de crizotinib</p>
Mélanome	<p>Mutations de <i>BRAF</i></p> <p>Mutations de <i>KIT</i>*</p>	Prescription de vemurafenib ou de dabrafenib
Glioblastome	Méthylation de <i>MGMT</i>	Sensibilité au temozolomide





Le diagnostic moléculaire





Génotypage et conservation de l'échantillon biologique



- Type de prélèvement
 - Pièce opératoire (**exérèse** ou **biopsie**)
 - **tumeur primitive** ou **métastase**
- Mode de conservation
 - Prélèvements fixés en formol* tamponné ou AFA et inclus en paraffine.





Préparation de l'échantillon biologique

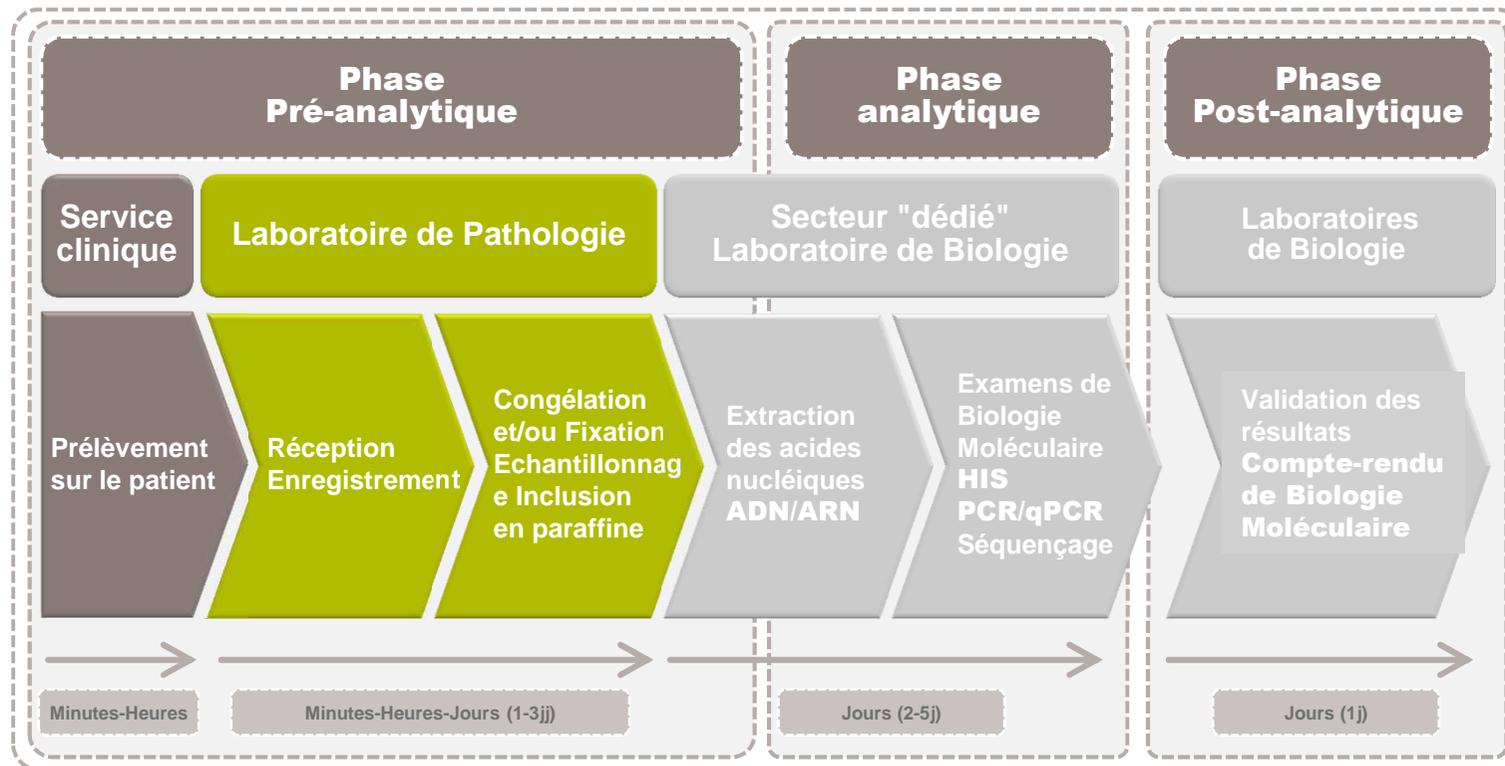
- **Contrôle morphologique** microscopique
 - sur **lame après coloration standard** (Hématoxyline / Eosine / Safran) réalisé par un pathologiste.
- **Extraction d'ADN tumoral** après réalisation de 4 à 5 lames blanches (épaisseur entre 4 et 20 μm).
 - **Sélection des régions les plus riches en cellules cancéreuses.**

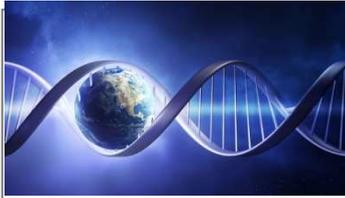


- Réalisation d'une **macrodissection** pour enrichir l'échantillon testé en cellules cancéreuses.



Les phases de l'examen

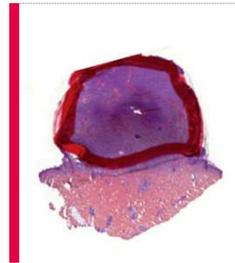




Les phases de l'examen



Tumeur fixée au formol, incluse en paraffine (FFPE)
cytoponction



Coloration à l'hématoxyline-éosine



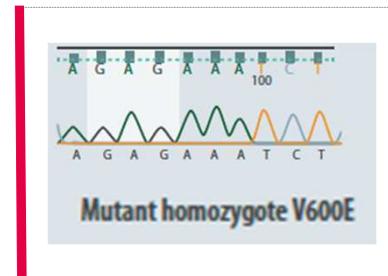
Macrodissection
< 50% de la tumeur



Extraction d'ADN



Quantification de l'ADN



Analyse des résultats
Exemple du séquençage Sanger



Technique de détection des mutations

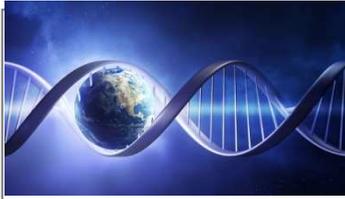


PCR en amont de certaines techniques de détection



Principales techniques de détection des mutations

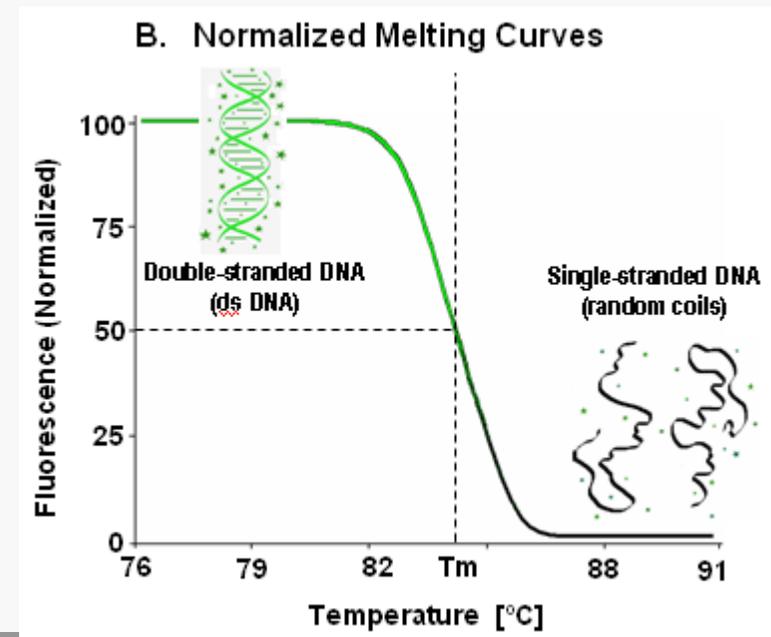
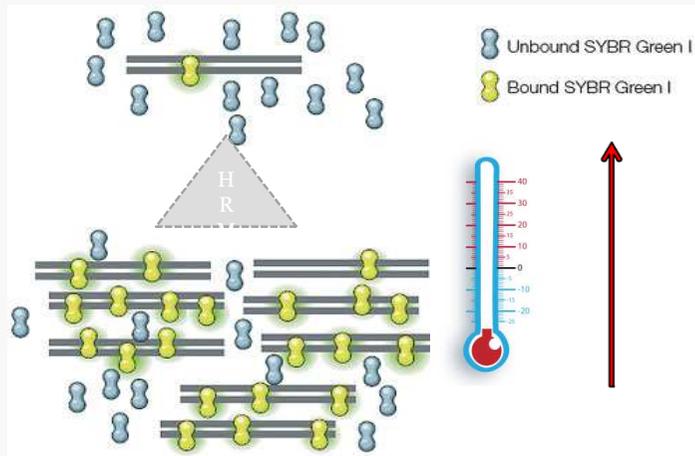
Technique	Quantitatif	Particularité
Séquençage Sanger	Non	Cette technique reste la technique de référence.
Mass Array (Séquanome)	Oui	Ne détecte que les allèles que l'on recherche.
SNaPshot	Non	Ne détecte que les allèles que l'on recherche.
HRM	Non	Cette technique ne permet qu'un dépistage. En cas de positivité, elle peut être complétée par une technique permettant l'identification de la mutation.
Pyroséquençage	Oui	Technique simple d'utilisation et assez peu coûteuse.
PCR temps réel	Oui	Ne détecte que les allèles que l'on recherche.
Séquençage à Haut débit	Oui	Très peu de laboratoires disposent actuellement des équipements nécessaires.
Immunohistochimie	?	Des anticorps spécifiques de la mutation p. <i>V600E</i> ont été développés. Ils ne sont pas encore disponibles commercialement.

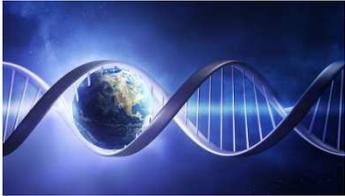


Le diagnostic moléculaire

technique HRM

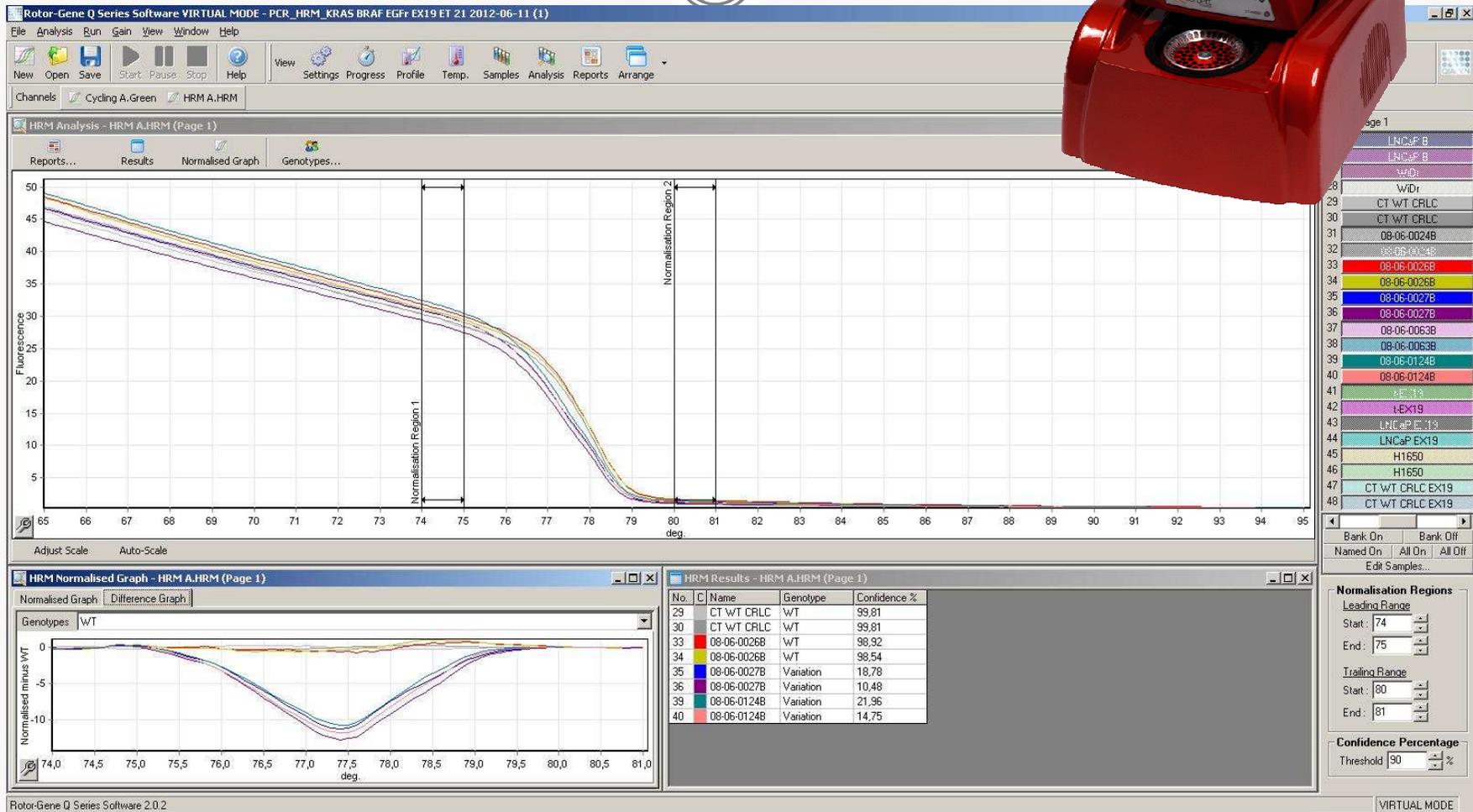
Basée sur la capacité différentielle des séquences d'ADN double brin à libérer un fluorophore en fonction de leur composition (ACGT) lors de la dénaturation

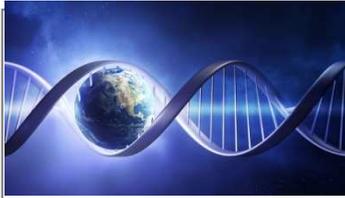




Le diagnostic moléculaire

technique HRM

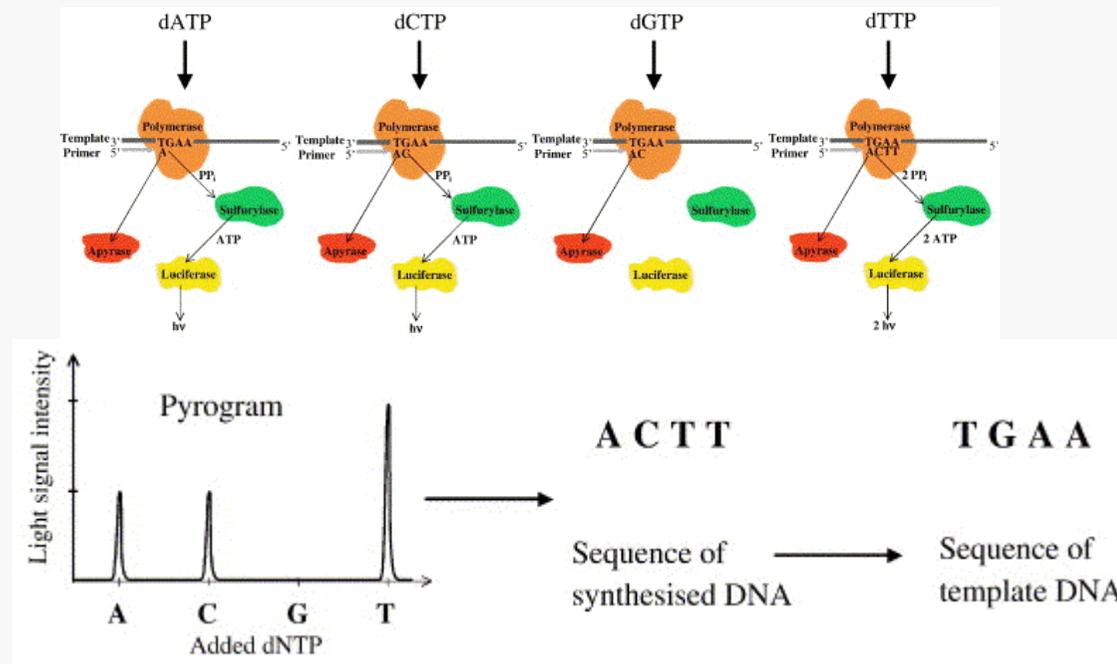


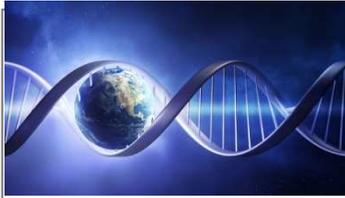


Le diagnostic moléculaire pyroséquençage

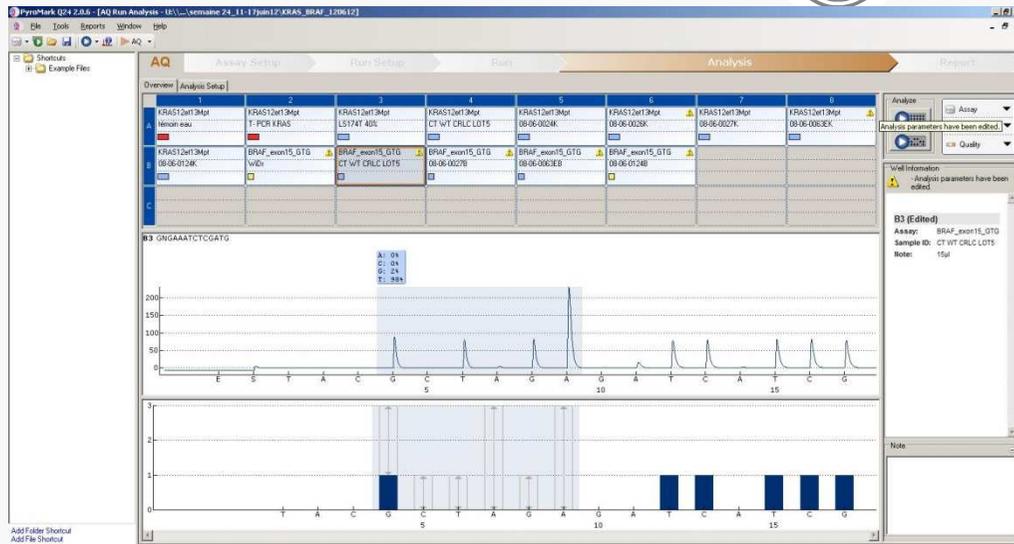


- Synthèse d'ADN à partir de l'ADN du patient
- L'incorporation des nucléotides est suivie par chimiluminescence

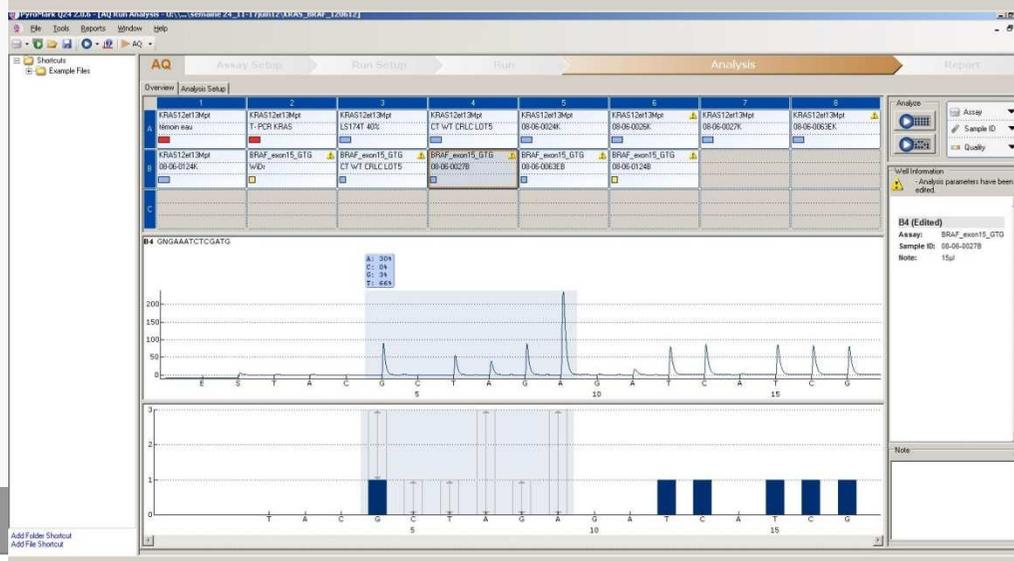




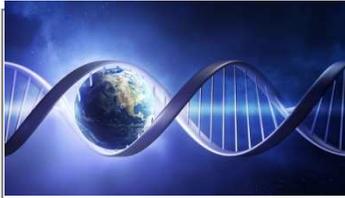
Le diagnostic moléculaire pyroséquençage



GTG : séquence sauvage



T diminué + apparition de A
Mélange de GTG + GAG
Mutation c1799T>A -pV600E



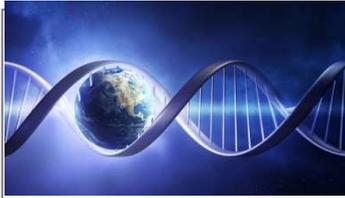
Le diagnostic moléculaire

séquençage direct

Confirmation : méthode exhaustive bien que peu sensible

- **Séquençage classique : 10-20%**
- **PCR allèle spécifique : 3%**
- **Pyroséquençage : 2%**





Le diagnostic moléculaire

compte-rendu de l'examen



CRLC Val d'Aurelle
Paul-Lamarque

Dr Pierre-Jean LAMY
Dr Frédéric MONTELS

Laboratoire de Biologie Spécialisée
N°34-194 - Biologie moléculaire - Agrément radiométrologique IS 273 LC
Tél. : 04.67.61.31.40 - Fax :04.67.63.28.73 - E-mail : crebs@montpellier.unicancer.fr

Madame [REDACTED]

Date de naissance: [REDACTED]

Dossier n° 05/ [REDACTED]

Pr GUILLOT Bernard [REDACTED]

Date de prélèvement:

[REDACTED]
34295 MONTPELLIER cedex 5

Edité le vendredi 22 juin 2012
BIOLOGIE MOLECULAIRE

ONCOGENETIQUE SOMATIQUE DES TUMEURS

Renseignements pré-analytiques

Date de réception : 09 AVRIL 2012

Laboratoire de Pathologie transmetteur : Service d'Anatomopathologie - CRLC Val d'Aurelle - MONTPELLIER Dr BIBEAU F.

Tissu tumoral : Bloc [REDACTED] Coupe paraffine Ganglion Métastase d'un mélanome malin

Cellules tumorales Plus de 50 %

RECHERCHE DE MUTATION DU GENE BRAF :

par analyse des courbes de fusion à haute résolution (HRM) et pyroséquençage (codon 600).

Gène BRAF exon 15 : Présence de mutation

CONCLUSION: Présence d'une mutation hétérozygote

Mutation c.1799T>A, p.V600E

RECHERCHE DE MUTATION DU GENE KIT :

par séquençage direct des exons 8, 9, 11, 13, 17 et 18 du gène KIT, après amplification PCR de l'ADN génomique.

Gène KIT exon 8.....: Non étudié

Gène KIT exon 9.....: Non étudié

Gène KIT exon 11.....: Pas de mutation mise en évidence

Gène KIT exon 13.....: Non étudié

Gène KIT exon 17.....: Non étudié

Gène KIT exon 18.....: Non étudié

CONCLUSION : Le séquençage direct n'a pas mis en évidence de mutation sur les exons étudiés

Remarque : La sensibilité des tests ne permet pas la détection de mutations présentes sur un contingent cellulaire minoritaire dans l'échantillon

Phase pré-analytique : F. BIBEAU

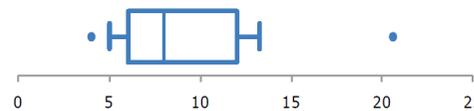
Validé le 13/04/12 : F. MONTELS



Problèmes liés au prélèvement

- Un circuit compliqué et long

Figure 14. Répartition des délais de rendu des résultats entre laboratoires (jours)



KRAS rapport d'activité Inca 2011

- Matériel extrait est de qualité médiocre
 - Ancienneté
 - Fixation (ADN dégradé)

Tableau 4. Taux de mutations et de résultats non interprétables en fonction de la technique utilisée

	Taux de mutations	Taux de résultats non interprétables	Nombre de patients (nombre de laboratoires)
ASO	33,8 %	1,4 %	355 (2)
HRM + séquençage	37,4 %	1,9 %	2905 (8)
Pyroséquençage	41,8 %	5,6 %	2862 (7)
Séquençage	39,0 %	2,5 %	3137 (11)
Snapshot	40,0 %	3,3 %	2422 (5)
Sondes Taqman	39,6 %	1,8 %	3302 (10)
GLOBAL	39,4 %	3,5 %	14 983 (43)

KRAS rapport d'activité Inca 2011

**Des résultats hétérogènes :
Un problème technique?**



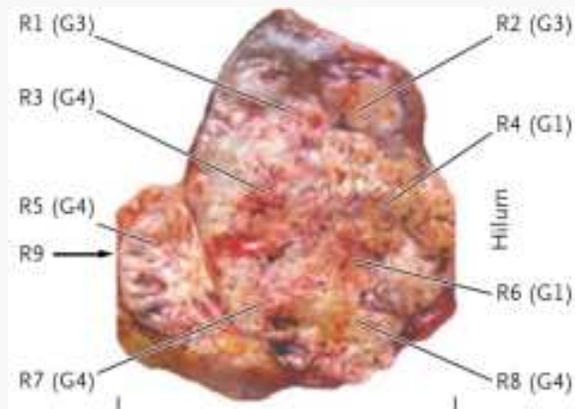
Le problème de l'hétérogénéité tumorale

Cancer du rein traité par everolimus

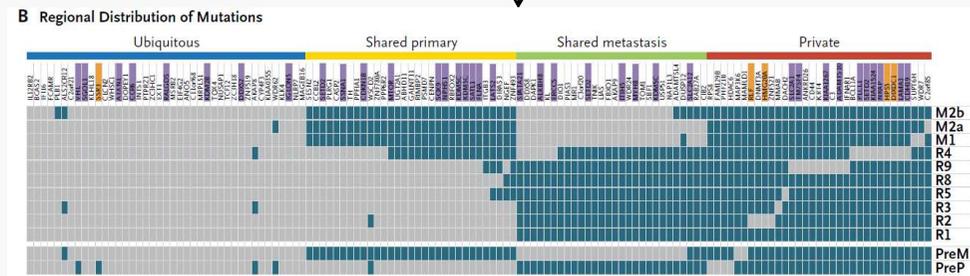
---- biopsies----

R : tumeur primaire

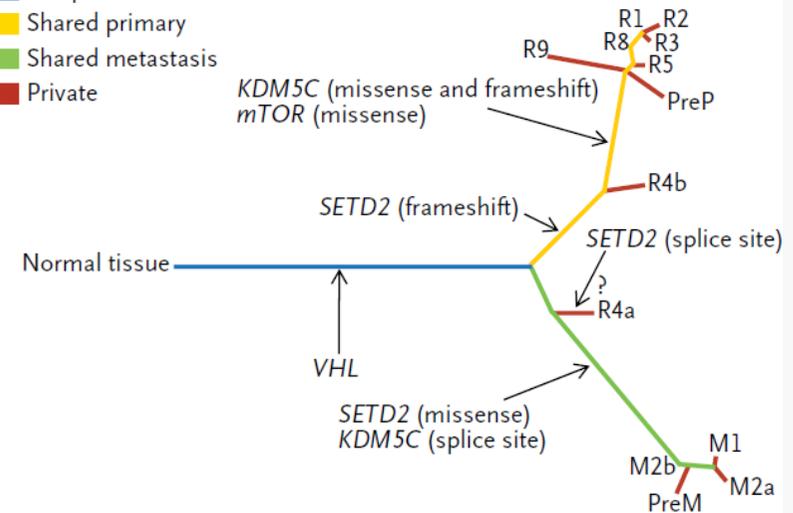
M: métastases



Séquençage haut-débit



- Ubiquitous
- Shared primary
- Shared metastasis
- Private



ESTABLISHED IN 1812 MARCH 8, 2012 VOL. 366 NO. 10

Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing

Marco Gerlinger, M.D., Andrew J. Rowan, B.Sc., Stuart Horswell, M.Math., James Larkin, M.D., Ph.D.,



Questions



- Doit-on utiliser la tumeur primaire pour traiter la métastase?
- Comment suivre les patients au cours du temps?
- Doit-on re-biopsier les patients (et quelle biopsie choisir)?

Une solution?



LA BIOPSIE LIQUIDE

**OU L'ANALYSE DE L'ADN ET DES CELLULES
CIRCULANTES**



CellSearch™ System

cellsave™
Preservative Tube



7.5 mL of blood

celltracks™
autoprep system



MagNest™



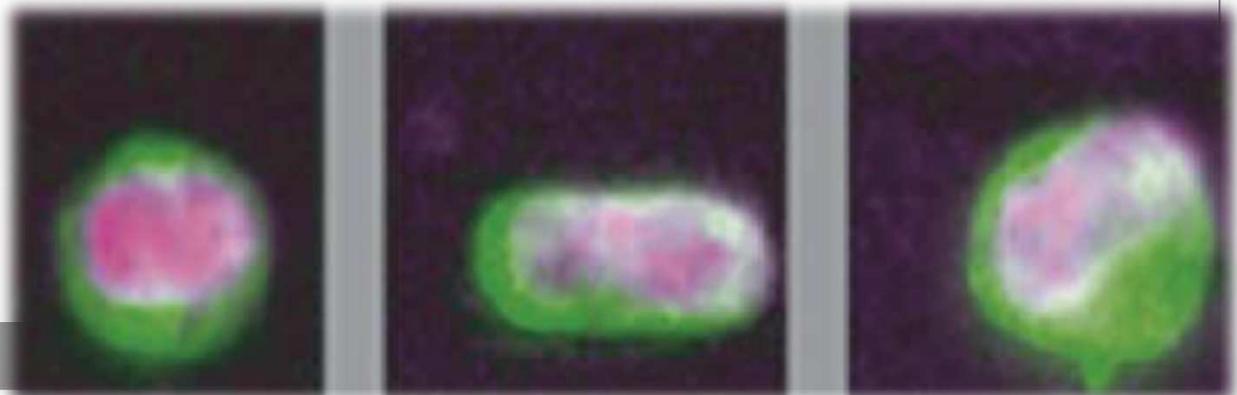
cellspotter™
analyzer



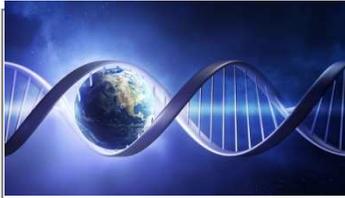
Cell Search™
Epithelial Cell Kit



Isole les cellules épithéliales
Avec des Ac anti-EPCAM

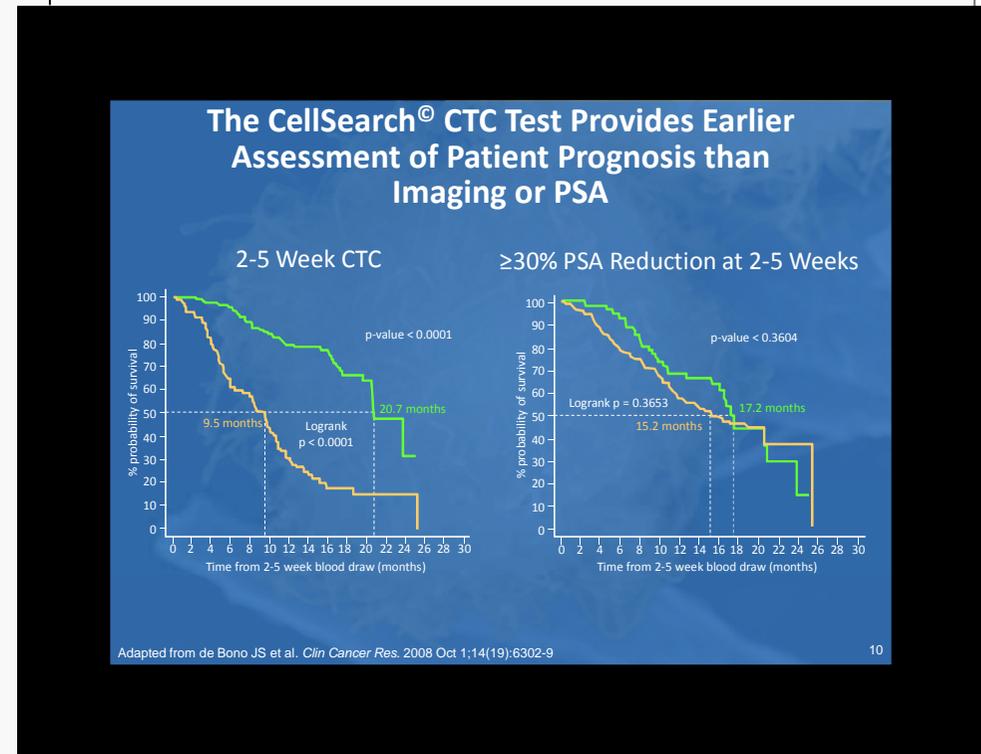


D'après C. Alix Panabières



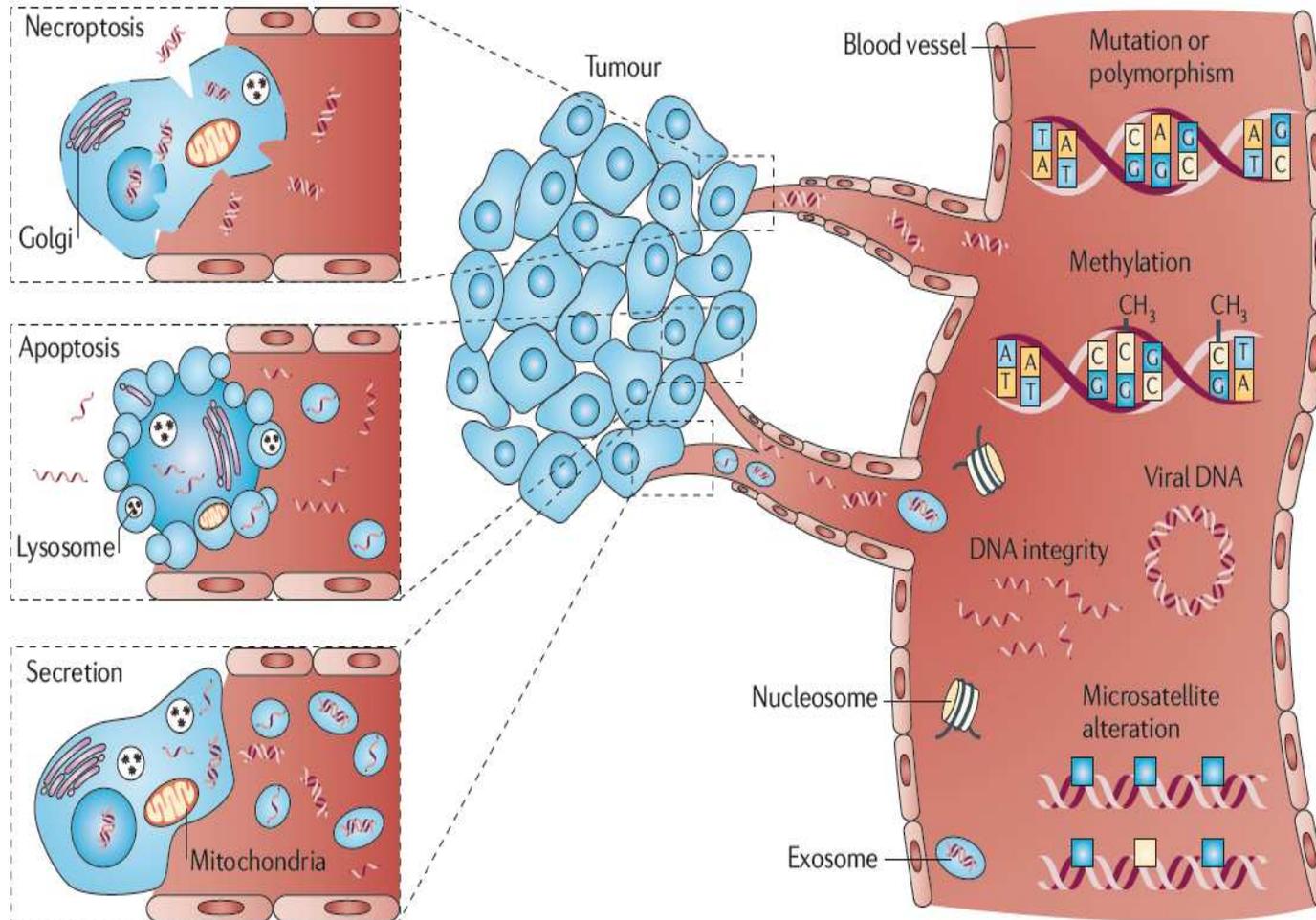
Intérêt clinique

- Contribuer à la détection précoce d'un cancer solide et/ou donner une information pronostique indépendante
- Contribuer au diagnostic biologique précoce des rechutes métastatiques cliniques
- Devenir un *nouveau biomarqueur* pour évaluer l'efficacité des traitements chez des patients ayant un cancer.





L'ADN circulant



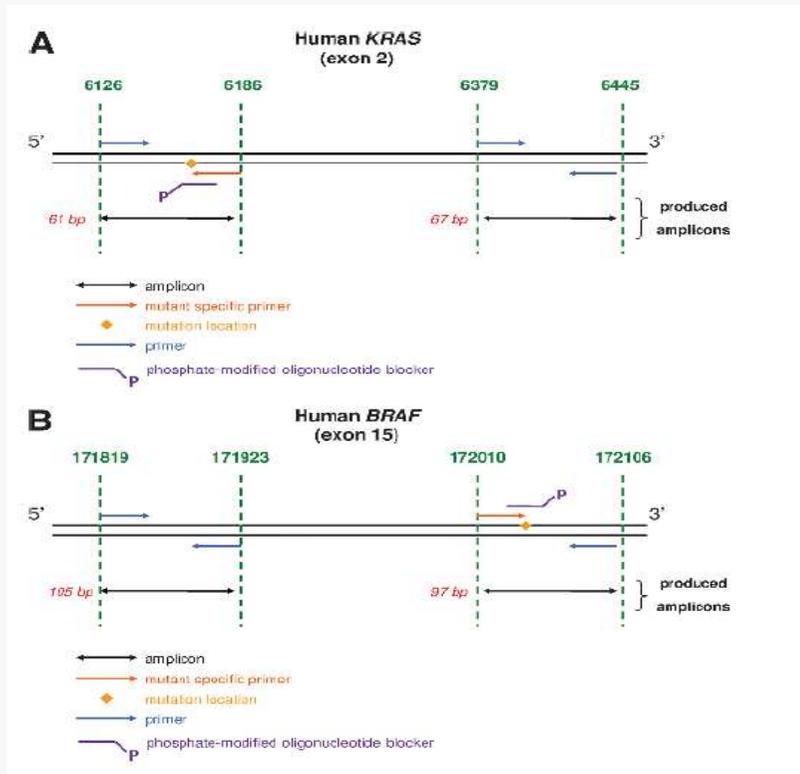
Prélèvement de sang avant ttt

Extraction d'ADN circulant

Analyse de l'ADN

80-100% de concordance Avec le tissu

Etude Kplex : détection des mutations Kras et Braf dans les CRC

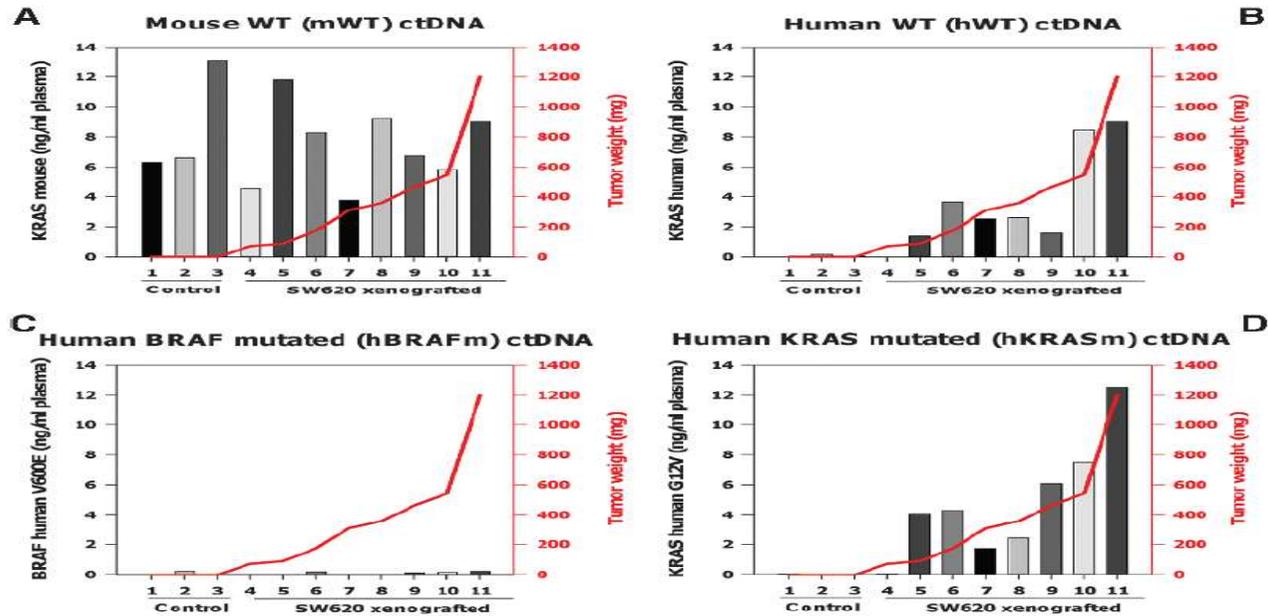


Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High *KRAS* or *BRAF* Mutation Load^{1,2}

Florent Moulriere^{*,†,§,¶,||}, Safia El Messaoudi^{*,†,§,¶,||},
Celine Gongora^{*,†,§,¶}, Anne-Sophie Guedj^{||},
Bruno Robert^{*,†,§,¶}, Maguy Del Rio^{*,†,§,¶},
Franck Molina^{||}, Pierre-Jean Lamy[¶],
Evelyne Lopez-Crapez[¶], Muriel Mathonet^{**},
Marc Ychou^{††}, Denis Pezet^{††}
and Alain R. Thierry^{*,†,§,¶,||}

-Modèle de souris xénotreffées : nude + SW 620 CRC (0.8ml) homozygote *KRAS* G12V

-plasma de patients (méta et non méta)



- les taux d'ADN circulants humains sont corrélés à la masse tumorale (B-D)
- Les taux d'ADN circulants murins ne le sont pas (A)

KPLEX Results



Table 2. Concordance between Tumor-Tissue Analysis and ctDNA Analysis (N=95)

Tumor-Tissue Analysis						
	KRAS	Mutant	WT	Sensitivity	Specificity	Accuracy
ctDNA Analysis	Mutant	36	1	92%	98%	96%
	WT	3	55			
	<i>Total</i>	39	56			
BRAF						
	Mutant	WT	Sensitivity	Specificity	Accuracy	
ctDNA Analysis	Mutant	5	0	100%	100%	100%
	WT	0	90			
	<i>Total</i>	5	90			
All mutation						
	Mutant	WT	Sensitivity	Specificity	Accuracy	
ctDNA Analysis	Mutant	41	1	94%	98%	96%
	WT	3	50			
	<i>Total</i>	44	51			

Demain?



**PROTEOMIQUE
PUCES À PROTEINES
ET CERTAINEMEN D'AUTRES MARQUEURS
PROTEIQUES CIRCULANTS...**



MERCI de votre attention

Laboratoire de Biologie Spécialisée
et Oncogénétique- *Unité de Biopathologie*
Centre de ressource Biologique de l'ICM
**P-J Lamy - F. Montels –A.C. Laberenne-S Roques-C
Montelion- P Audran- N Lozano**

Service de Pathologie-*Unité de Biopathologie*
F Bibeau- H Frugier

CHRU Montpellier-UM1
C Alix-Panabières

Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier
Inserm U896
A Thierry

