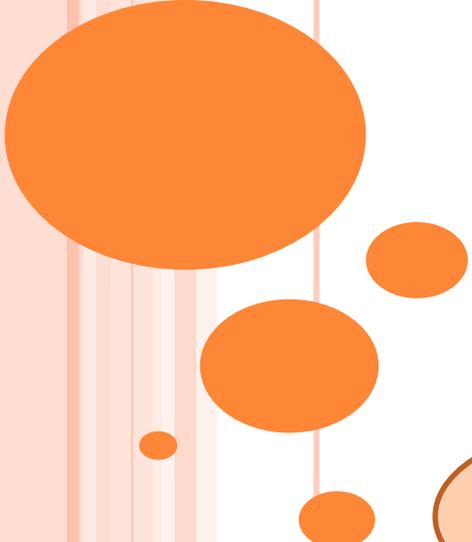


BIOPSIE LIQUIDE EN ONCOLOGIE THORACIQUE: EN PRATIQUE



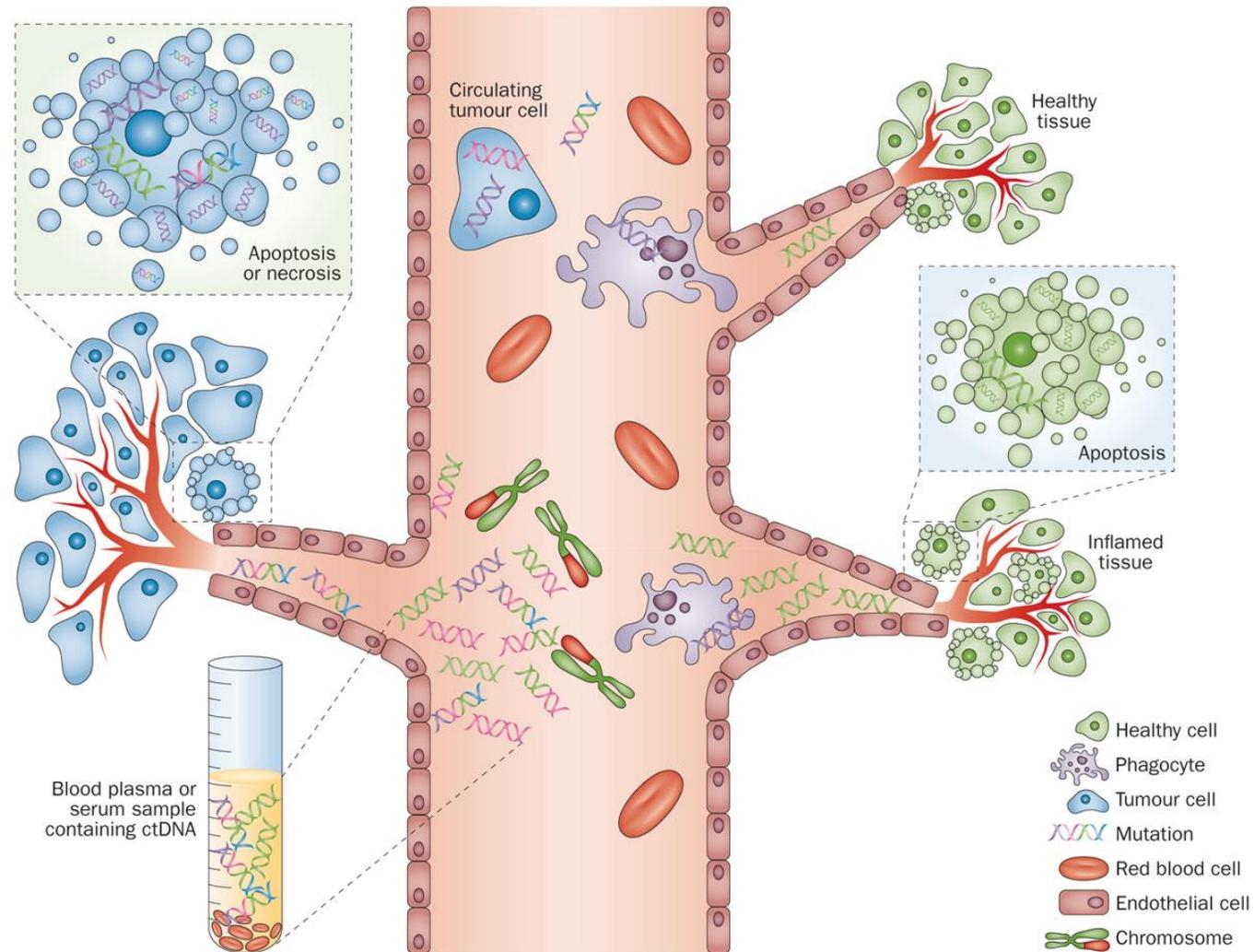
WHY?

WHEN?

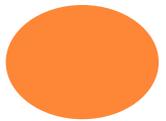
HOW?

Dr Cécile OLIVIER
SPIRAL 69 rue de la Louvière LILLE
Mardi 27 Mars 2018

ADN CIRCULANT: DÉFINITION



= test sanguin à visée tumorale



POURQUOI DÉTECTER LES MUTATIONS SUR ADN CIRCULANT?

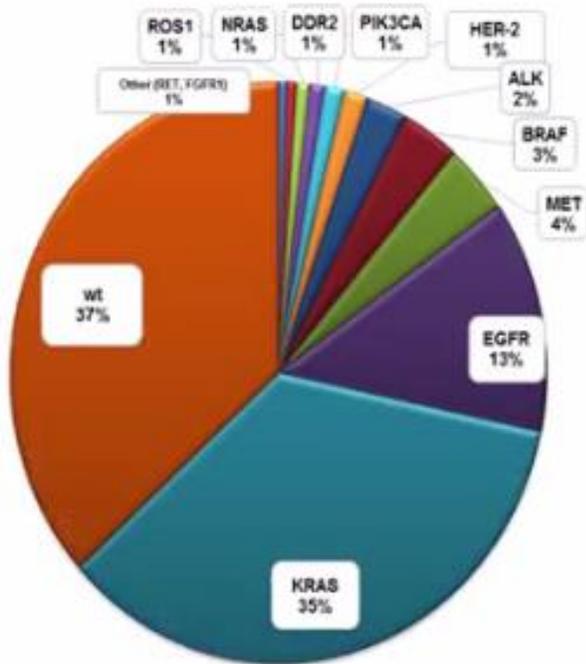
- Analyse de biomarqueurs (molécules ou protéines surexprimées ou anormales présentes ou absentes dans certains types de tumeur)
- Rôles des biomarqueurs:
 - Établir un dgc précis
 - Choisir un traitement ciblé
 - Suivre l'efficacité ou non d'un traitement
 - Établir un pronostic sur l'évolution d'une tumeur
 - Évaluer le risque d'apparition de métastases

WHY?

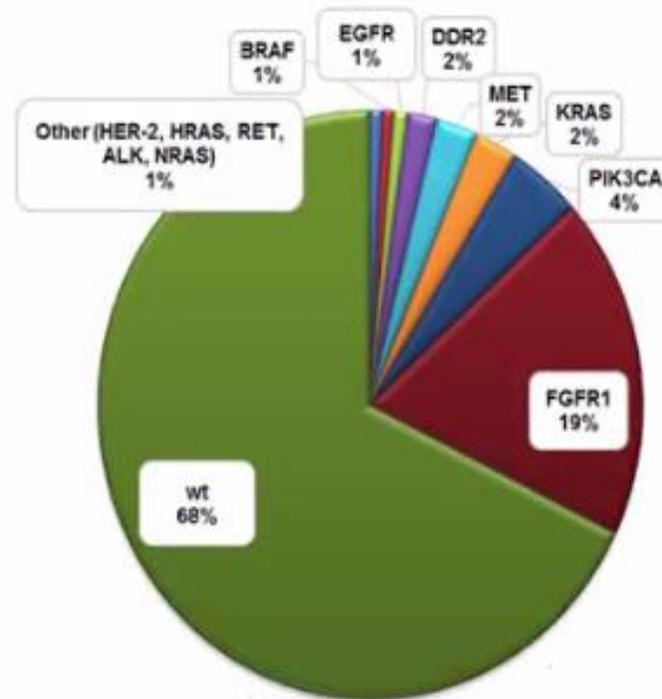


BIOMARQUEURS PRÉSENTS AU DIAGNOSTIC

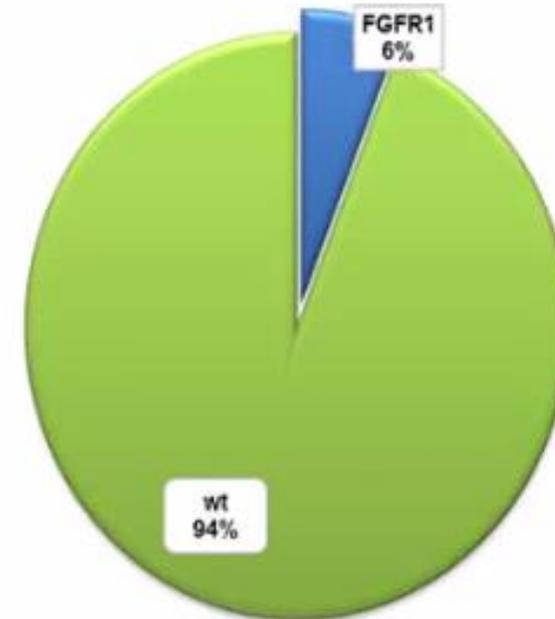
Non-Squamous NSCLC (n=4244)



Squamous NSCLC (n=1498)

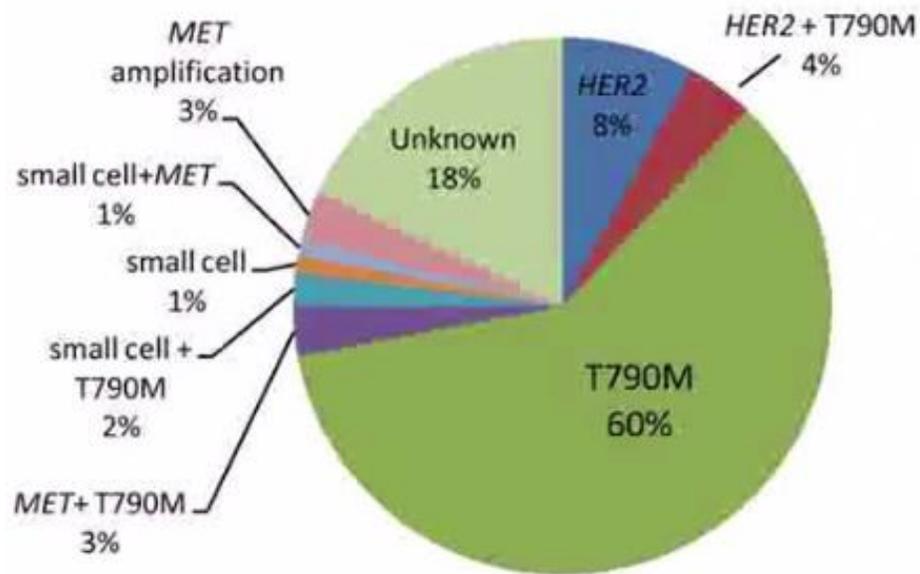


SCLC (n=468)



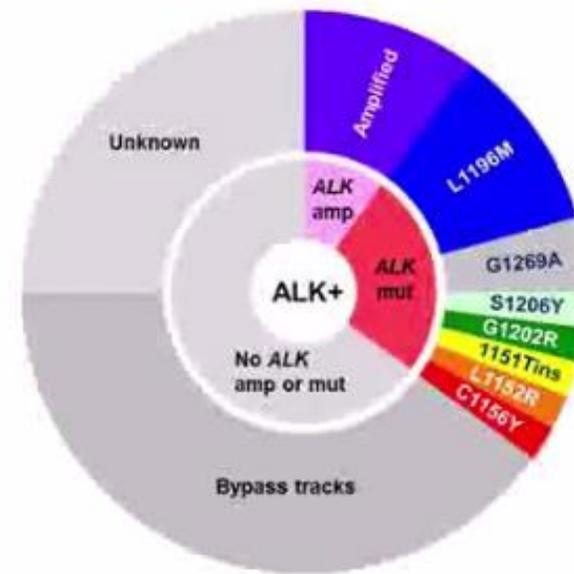
BIOMARQUEURS À LA PROGRESSION: DISSÉQUER LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE

Resistances secondaires aux EGFR TKI

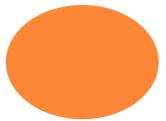


Yu et al, Clin Canc Res, 2013

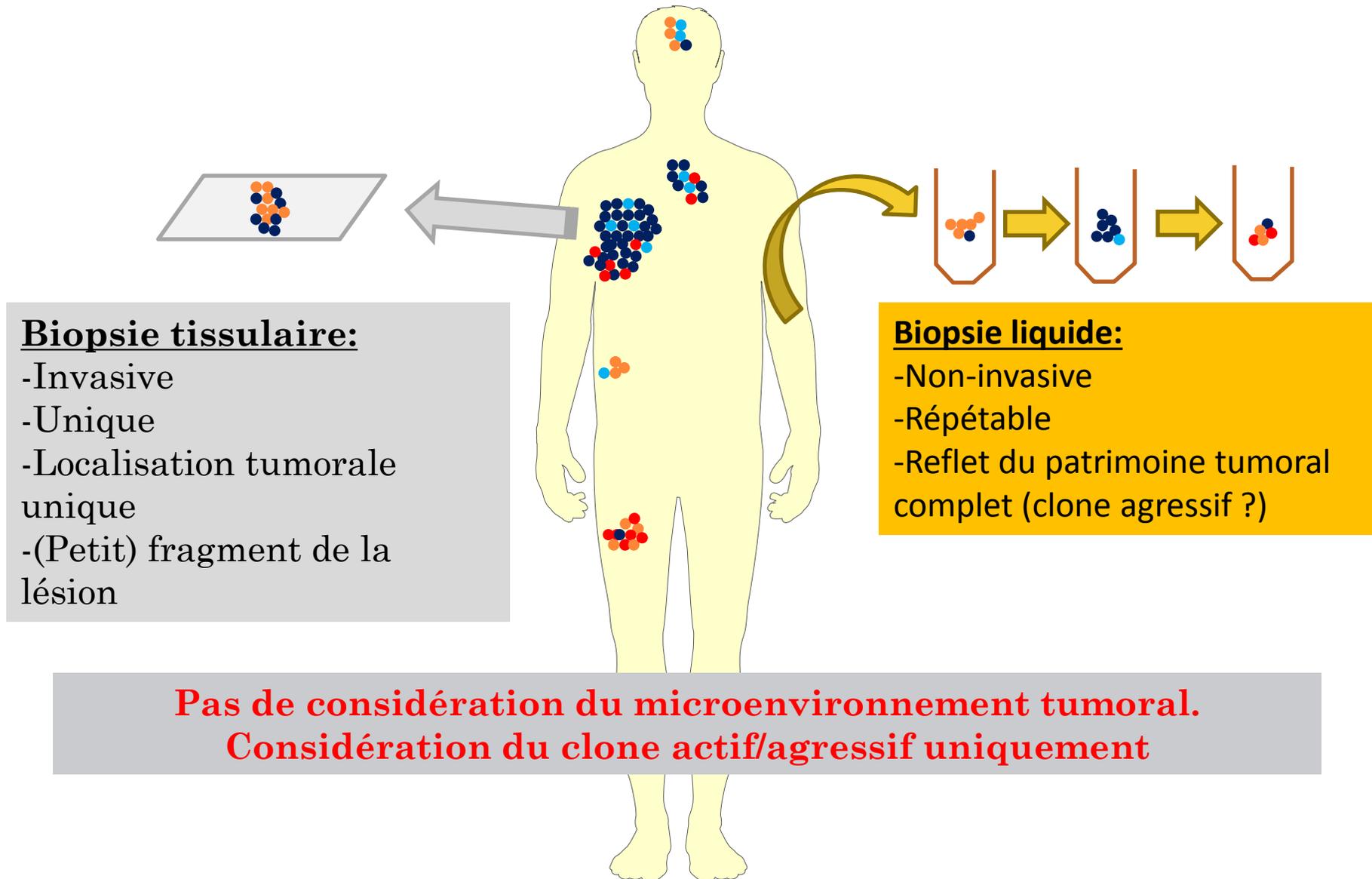
Resistances secondaires au crizotinib



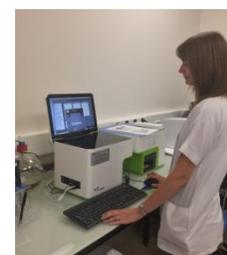
Doebele RC, et al. Clin Cancer Res 2012
Takeda M, et al. J Thorac Oncol 2013
Show, JCO, 2014



UN NOUVEAU PARADIGME INTÉGRANT L'HÉTÉROGÉNÉITÉ TUMORALE



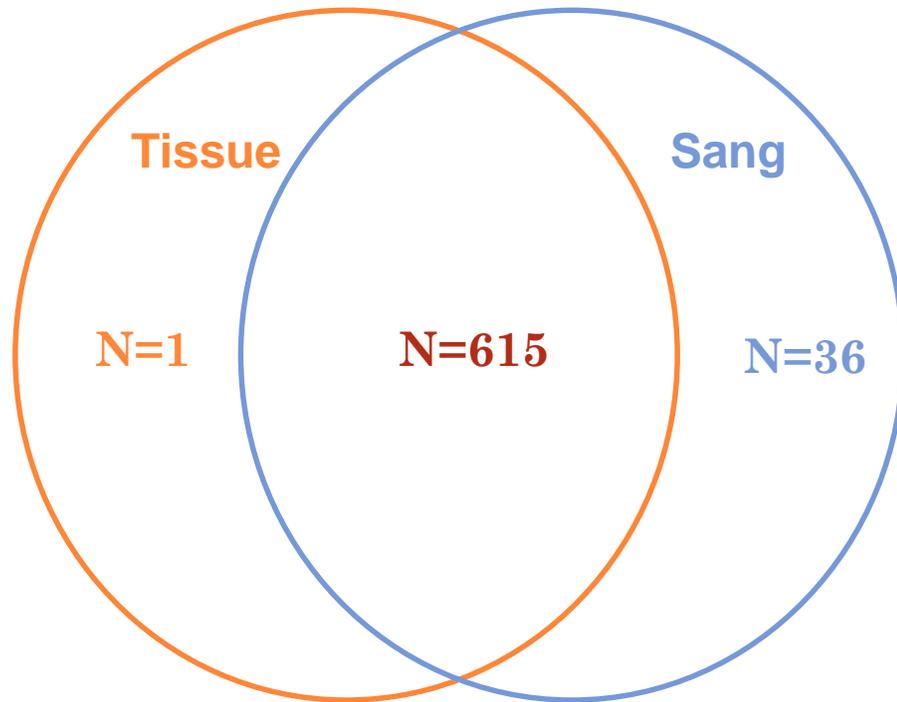
DES OUTILS ULTRAPERFORMANT



	Cobas EGFR Therascreen EGFR ARMS-PCR	ddPCR	BEAMing	NGS
Seuil de détection	1%	0,2%*	0,02%	1% (0,5%)
Spécificité	100%	100%	100%	-
Multiplex	+	0	+	++++
Cibles	<i>Contraintes (kits)</i>	Selon développement t	Contraintes (kits)	Panels (50 → 250)
Coût analyse		250€	450€	250€



EXCELLENTE CONCORDANCE SANG-TISSU EXCELLENTE SPÉCIFICITÉ: PAS DE FAUX POSITIFS



Technique: Therascreen EGFR RGQ PCR kit; Qiagen, Crawley, UK

	Plasma 1 <i>EGFR</i> Mutation Status, <i>n</i>		Total
	Positive	Negative	
Tumor <i>EGFR</i> mutation status, <i>n</i> ^a			
Positive	69	36	105
Negative	1	546	547
Total	70	582	652

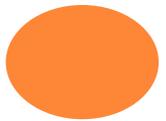
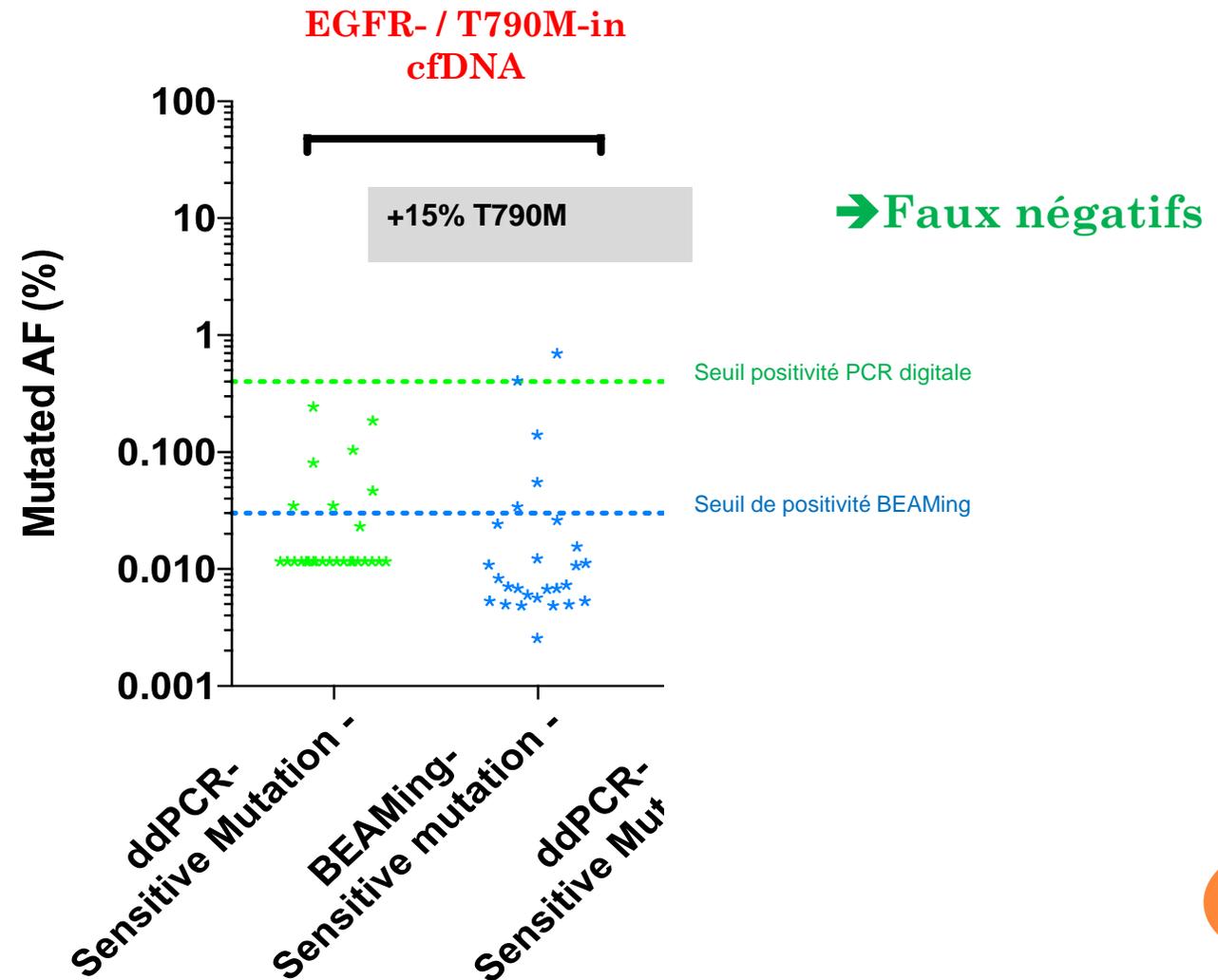
	<i>n</i>	Rate, %	95% Confidence Interval
Concordance	652	94.3	92.3–96.0
Sensitivity	105	65.7	55.8–74.7
Specificity	547	99.8	99.0–100.0
Positive-predictive value	70	98.6	92.3–100.0
Negative-predictive value	582	93.8	91.5–95.6

^aFor the comparison of tumor and plasma data, the tumor DNA mutation status was adjusted for the mutations analyzed in circulating-free tumor DNA from plasma (i.e., for exon 19 deletions, L858R point mutations and T790M point mutations only).

EGFR, epidermal growth factor receptor.

SENSIBILITÉ VARIABLE: RISQUE DE FAUX NÉGATIFS

- Quantité d'ADN circulant
- Technique utilisée



L'INTÉRÊT DU NGS

ABL1	5	CSF1R	2	FBXW7	6	GNAS	2	KIT	14	NPM1	1	STK11	5
AKT1	2	CTNNB1	1	FGFR1	2	HNF1A	4	KRAS	3	NRAS	3	SMAD4	10
ALK	2	DDR2	1	FGFR2	4	HRAS	2	MAP2K1	5	PDGFRA	4	SMARCB1	4
APC	9	DNMT3A	1	FGFR3	6	IDH1	1	MET	6	PIK3CA	11	SMO	5
ATM	19	EGFR	9	FLT3	4	IDH2	2	MLH1	1	PTEN	14	SRC	1
BRAF	2	ERBB2	4	FOXL2	1	JAK2	2	MPL	1	PTPN11	2	TP53	21
CDH1	3	ERBB4	8	GNA11	2	JAK3	3	MSH6	4	RB1	12	TSC1	1
CDKN2A	2	EZH2	1	GNAQ	2	KDR	9	NOTCH1	3	RET	6	VHL	3

Screening large et commun aux différents organes.

Très bonne spécificité

Sensibilité moindre → Couplage avec des techniques plus sensibles pour les cas douteux (Interaction bio-pathologistes / cliniciens +++)

Accès aux ressources bio-informatiques ?

- Applications → Toute anomalie **déTECTABLE** et **CIBLABLE**
 - Mutations de résistance ALK, BRAF, MET...



QUAND DÉTECTER LES MUTATIONS SUR ADN CIRCULANT?

- ADNc en première intention:
 - Patient sous TKI première ligne: recherche de T790M à la progression
 - Patient fragile biopsie impossible: primodétection de mutation EGFR
- ADNc en deuxième intention (échec sur tissu):
 - Bloc épuisé ou pauci cellulaire
 - Mauvaise qualité d'ADN (os)
- ADNc et suivi:
 - Disparition réapparition mutation
 - Efficacité sous traitement
 - Détection rechute

Stades 4
Adénocarcinomes
Tous CBNPC si non-fumeur

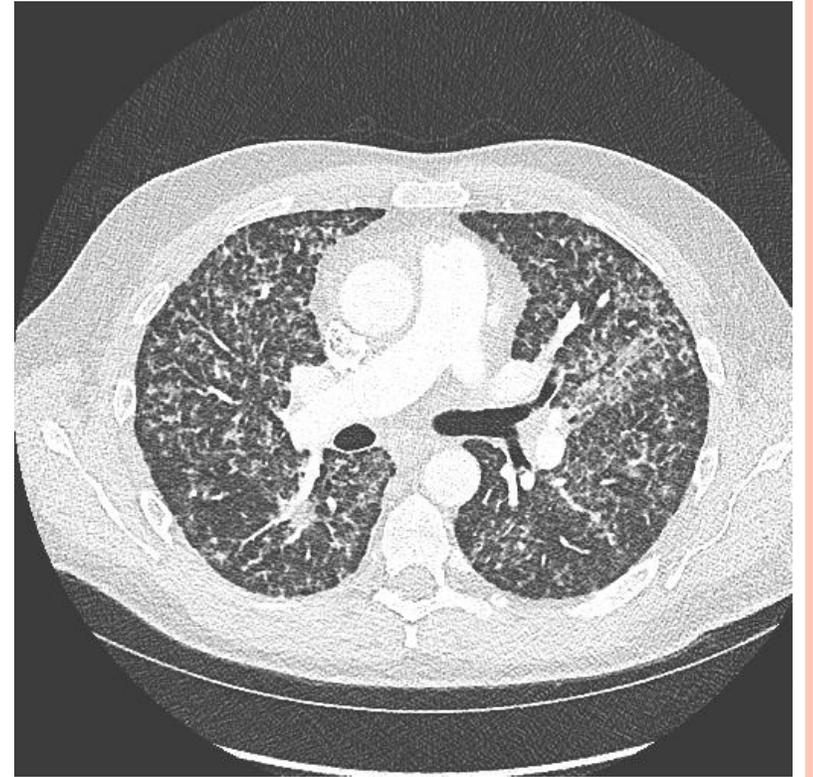
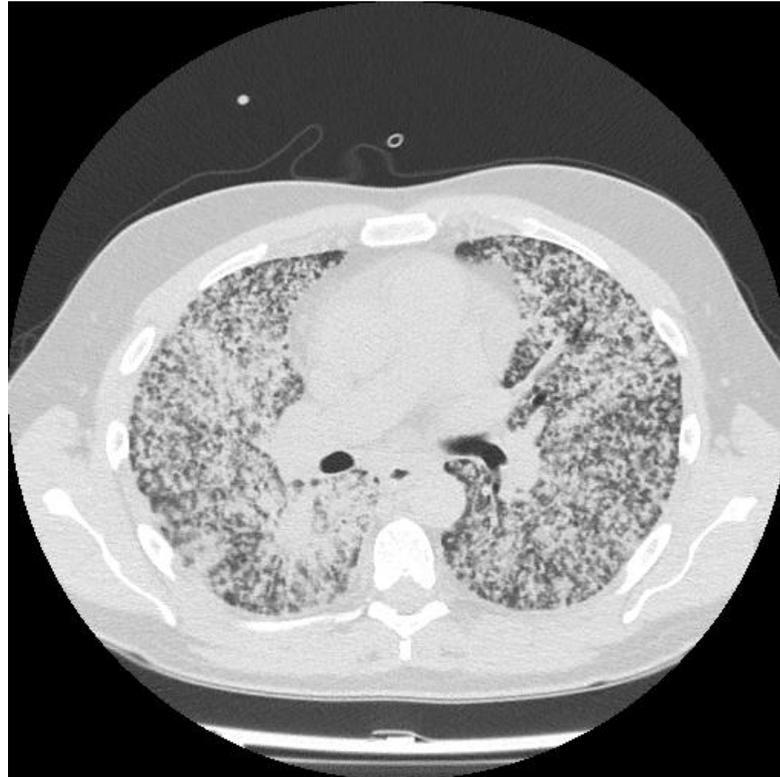
WHEN?



Au diagnostic: Monsieur R.

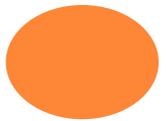
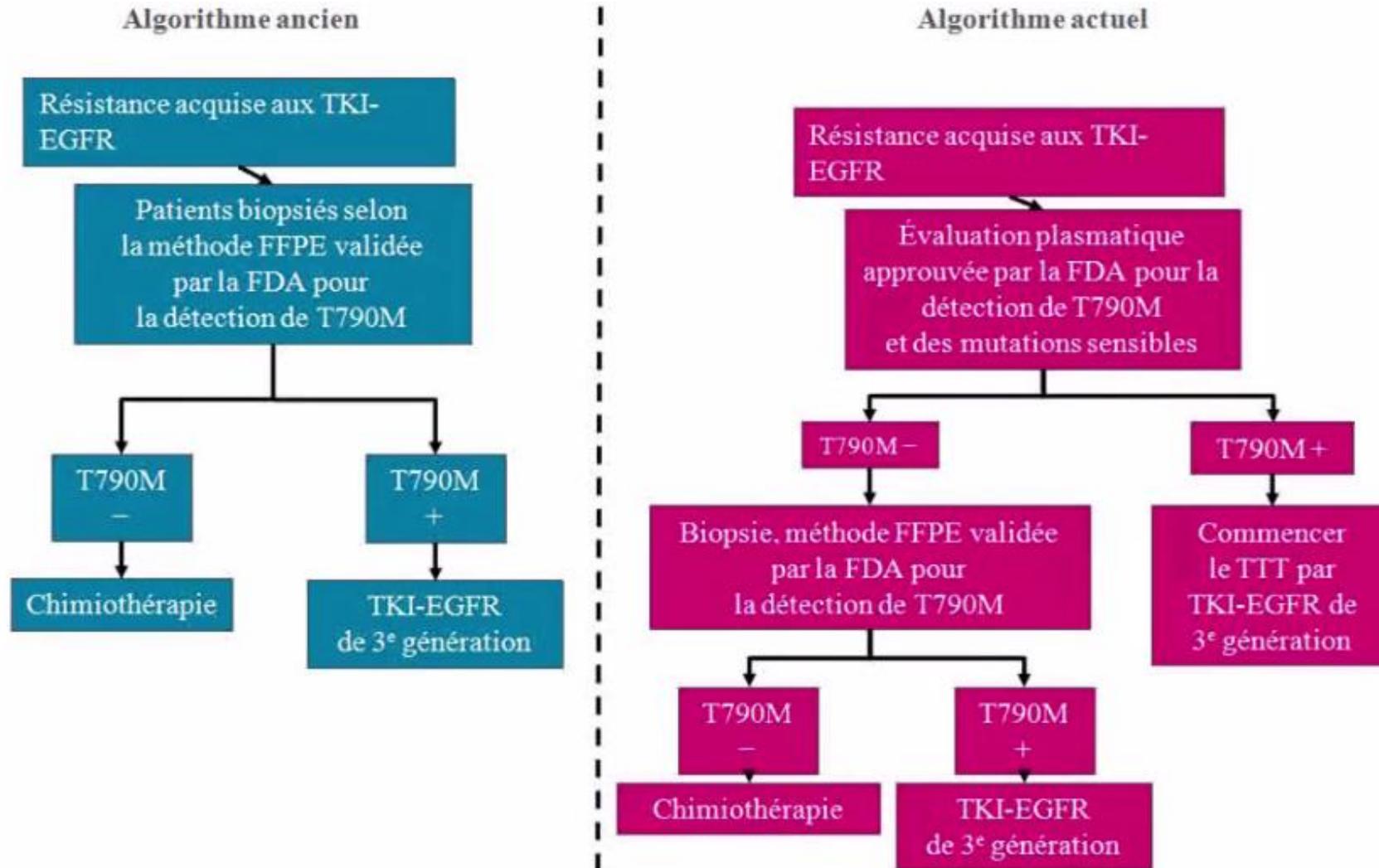
- 53 ans, non fumeur, OMS:0, pas d'ATCD
- Déc 2014, hospitalisé pour détresse respiratoire subaiguë
- Traitement par AFATINIB (giotrif) 40mg/j

M2



À LA RECHUTE

- Recherche de mutation EGFR de T790M lors de la résistance acquise aux EGFR TKI de 1ere ou 2eme génération



EN PRATIQUE: LA PRESCRIPTION



Centre Hospitalier Régional
Université de Lille



Recherche de mutations du gène *EGFR* sur ADN circulant à partir d'un prélèvement sanguin

> **Indication** : Recherche de mutations du gène *EGFR* en l'absence de tissu pulmonaire/métastatique disponible (ou tissu non contributif) dans un cadre diagnostique avant mise sous traitement anti-EGFR d'un Cancer bronchique Non à Petites Cellules (CBNPC)

> Identité du patient

Nom : Norm d'épouse : Prénom :

Date de naissance :/...../..... Sexe : Masculin Féminin

> Renseignements cliniques

Statut tabagique : Non fumeur (consommation totale < 100 cigarettes)
 Ancien fumeur
 Fumeur Actif
 Tabagisme passif

Année de début :
Année d'arrêt :
Consommation (paquet/jour) :

> Renseignements concernant le cancer pulmonaire

Diagnostic histologique :

Métastase : Non Oui

Foie Os
 Cerveau Surrénale
 Ganglion extrathoracique Autre :

Projet thérapeutique :

Le résultat de la recherche de mutations EGFR servira à

Un traitement de 1^{ère} ligne par
 TKI (*) Chimiothérapie Prise en charge palliative

Un traitement de 2^{ème}/3^{ème} ligne par TKI

Dans ce dernier cas, quels sont les éventuels traitements antérieurs ou en cours :

Chirurgie Chimiothérapie Radiothérapie
 Anti-angiogénique Autre

> Prescripteur

Nom :

Téléphone :/...../.....

Fax :/...../.....

Mail :

Cachet et Signature :

(2 pages)

> Prélèvement et envoi

Date du prélèvement :/...../.....

Heure du prélèvement :

Tube EDTA : Prélèvement sanguin sur 2 tubes EDTA de 5 ml

Les prélèvements doivent être centrifugés dans les 2 heures



Tube EDTA

- Envoyer les tubes EDTA dans les deux heures qui suivent le prélèvement, à température ambiante, et prévenir la plateforme (Tel : 03 20 44 42 93)
- Ou**
- Centrifuger le prélèvement sur place à 2000g pendant 10 min - **Noter l'heure de centrifugation**

Décanter dans un tube à hémolyse -
Congeler le plasma à -20°C
Envoyer le plasma congelé dans de la carbo glace
Prévenir si possible le laboratoire

Tube BCT : Prélèvement sanguin sur 1 tube BCT de 10 ml



Tube BCT

Prélèvement sur tube BCT (Evite la lyse cellulaire)
Conservation possible quelques jours à température ambiante
Envoi du prélèvement à température ambiante

A joindre au prélèvement :

- Compte-rendu Anatomopathologique
- Fiche de renseignement complétée

Adresse de l'envoi :

Plateforme de Biologie Moléculaire - Dr Escande
Pôle de Biologie Pathologie Génétique du CHU de Lille
Bd du Professeur J. Leclercq
59 037 LILLE CEDEX

HOW?

EN PRATIQUE: LES RÉSULTATS

***** LILLE

Cotation :

Prélevé le 29/11/17 à 09:47 Enregistré le 29/11/17 à 18:44 Edité le 13/12/17 à 11:06 Complet
Original envoyé à Clinique de la Louvière Service de Pneumologie et Copie envoyée à Pôle de Pathologie Anatomie & Cytologie Pathologiques

Secteur d'Oncologie et de Génétique moléculaires. (Tél : 03.20.44.42.93)

RECHERCHE DE MUTATIONS DES GENES EGFR - KRAS - BRAF - HER2

Nos références :	CP-EGFR.17.1634/TPL170298/
Raisons de la demande :	Cancer du poumon
Type histologique :	Inconnu
Type de prélèvement :	Plasma (tubes EDTA)
Type d'échantillon :	ADN
Date du bloc :	Date du prélèvement: 29/11/2017 à 9h45
Date de prescription :	29/11/2017
Prescripteur :	Dr Olivier, pneumologie, Clinique la Louvière, Lille
Date de réception :	29/11/2017

Résultat de l'analyse moléculaire

Résultats pour EGFR	Gène <i>EGFR</i> : Aucune anomalie détectée
Résultats pour panel NGS	Panel NGS: Aucune anomalie détectée

Interprétation

Dans la limite des techniques utilisées, aucune anomalie n'a été détectée dans le panel de cibles analysées, et en particulier dans le gène *EGFR*.

Ce résultat ne permet pas d'exclure une éventuelle mutation *EGFR* présente dans la tumeur mais non détectable dans le plasma.

Méthodes utilisées et sensibilités

Extraction de l'ADN circulant : kit QIAamp Circulating nucleic acid (Qiagen)

Gène *EGFR*: Analyse par PCR temps réel: kit theascreen *EGFR* RGQ V2 (Qiagen). Ce kit permet la détection des mutations suivantes: 19 délétions dans l'exon 19, L858R et T790M (RefSeq. NM_005228.3). Les seuils de détection préconisés par le fournisseur ont été adaptés pour une détection à partir du plasma (Douillard et al, J.Thor.Oncol.2014).

Panel NGS 2 pools (v1 21/08/2017) : séquençage par PCR multiplex Ampliseq (Panel à façon) sur Ion Proton system (Life technologies) et analyse par le logiciel Torrent Suite V5.0 (Life technologies). La profondeur minimale pour le rendu des résultats négatifs est fixée à 500x.

Gène (Séquence de référence) Exons analysés: ACVR1 (NM_001347664.1) 6-9; AKT1 (NM_005163.2) 3; ALK (NM_004304.4) 22-25; BRAF (NM_004333.4) 11 et 15; CTNNA1 (NM_001904.3) 3; EGFR (NM_005228.3) 12,18-21; ERBB2 (NM_004448.3) 8,19-21; ERBB4 (NM_005235.2) 3; FGFR1 (NM_023110.2) 4,7,12 et 14; FGFR2 (NM_000141.4) 7,9,12,14; FGFR3 (NM_000142.4) 7,9,14,16,18; GNA11 (NM_002067.2) 4-5; GNAQ (NM_002072.3) 4-5; GNAS (NM_080425.3) 8; H3F3A (NM_002107.4) 2; H3F3B (NM_005324.4) 3; HIST1H3B (NM_003537.3) 1; HIST1H3C (NM_003531.1) 1; HRAS (NM_005343.2) 2-4; IDH1 (NM_00596.3) 4; IDH2 (NM_002168.2) 4; KIT (NM_000222.2) 8,9,11,13,14,17,18; KRAS (NM_033360.3) 2,3,4; MAP2K1 (NM_002755.3) 2-3,6; MET (NM_001127500.1) 2,14-20; NRAS (NM_002524.4) 2-4; PDGFRA (NM_006206.4) 12,14,18; PIK3CA (NM_006218.2) 2-3,8,10,14,21; PTEN (NM_000314.6) 1,3,5-8; PTPN11 (NM_001330437.1) 3,7-8; SMAD4 (NM_005359.5) 4,6,7,9-13; TP53 (NM_000546.5) 2,4,5,6,7,8,10

Les méthodes utilisées permettent la détection d'une mutation somatique si elle est présente dans au moins 10% des cellules de l'échantillon. Un résultat négatif n'exclut pas la présence de mutations.

(BID) Si votre patient présente un CBNPC, il convient de s'assurer de sa non-opposition à ce que les informations contenues dans ce compte-rendu et les données cliniques associées fassent l'objet d'un traitement informatique dans le cadre de l'étude CBNPC², (BID) cohorte régionale des cancers bronchiques non à petites cellules de la région Nord Pas de Calais. Ce traitement a été autorisé par la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL). Conformément à la loi "Informatique et Liberté", le patient dispose d'un droit d'accès, de modification, de rectification et de suppression des données le concernant en écrivant à alexis.cortot@chru-lille.fr (BID)

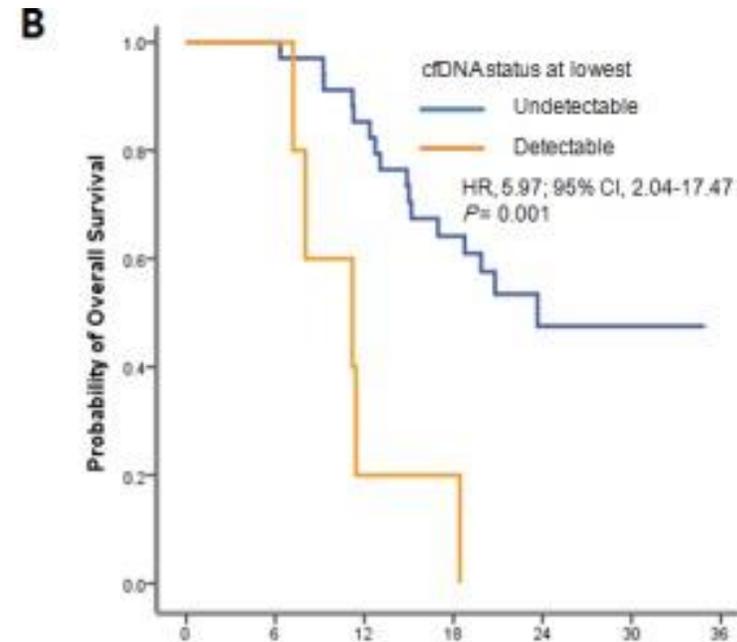
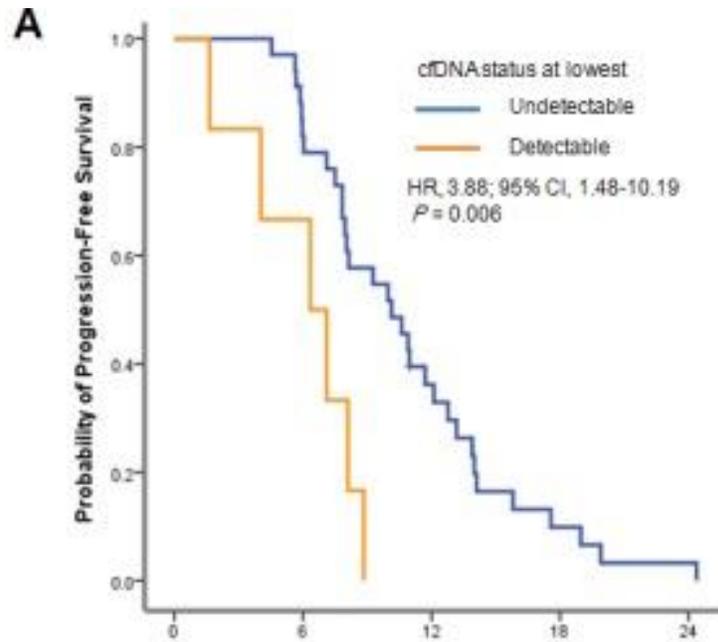
Validé par (BID) Docteur Olivier FARCHI

ADN TUMORAL CIRCULANT: PERSPECTIVES

- Autres sources: urine, LCR
- Autres questions:
 - Monitoring des altérations moléculaires
 - Détermination de la charge mutationnelle pour immunothérapie



LA RÉPONSE MOLÉCULAIRE COMPLÈTE EST UN FACTEUR PRONOSTIC DES CBNPC EGFR+



○ Merci de votre attention

