



# Retour d'expérience : Laboratoire de Biologie des Tumeurs Solides

**Julie VENDRELL, Ph.D.**

*CHU Montpellier*

*Pr. Solassol*

# Présentation du laboratoire

## ❖ Activités

- Marqueurs Tumoraux
- HPV
- Oncogénétique constitutionnelle
- Oncogénétique somatique



## ❖ RH

- Biologistes : 1 PU-PU, 2 MCU-PH, 1 PH
- Ingénieurs : 2 Technique, 1 Bioinfo
- Techniciens : 11
- AMA : 1
- CDS

# Présentation des activités d'oncogénétique somatique

## Prélèvements tissulaires

### ❖ ADN

- SNV, indels (panel 53 gènes) (n = 2472) *AdiVar*
- CNV (n = 751) *MIAMs*
- Instabilité microsatellitaire (n = 572) *ifCNV*
- Altérations gènes voie HR, MMR (n = 353) *Oryci*
- Instabilité génomique (score HRD) (n = 135) *sWGS*
- Gain et perte de copie de gènes : CGHarray (n = 284) 1 run / sem
- Méthylation de promoteur (n = 297) 1 run / sem

### ❖ ARN

*ArcherDx™*

- Transcrits de fusion : panel « Lung » (n = 645)
- Transcrits de fusion : panel sarcome (n = 116)

## Biopsies liquides

### ❖ ADNtc (n = 520)

- Hotspot : ddCR 1 run / sem
- Panel plus large : NGS (en dev) *ctSOM*

# Présentation des activités d'oncogénétique somatique

## Prélèvements tissulaires

### ❖ ADN

- |  |               |   |              |
|--|---------------|---|--------------|
| - SNV, indels (panel 53 gènes) (n = 2472)              | <i>AdiVar</i> | } | 2 runs / sem |
| - CNV (n = 751)  | <i>MIAMs</i>  |   |              |
| - Instabilité microsatellitaire (n = 572)              | <i>ifCNV</i>  |   |              |
| - Altérations gènes voie HR, MMR (n = 353)             | <i>Oryci</i>  | } | 1 run / 15 j |
| - Instabilité génomique (score HRD) (n = 135)          | <i>sWGS</i>   |   |              |
| - Gain et perte de copie de gènes : CGHarray (n = 284) |               |   | 1 run / sem  |
| - Méthylation de promoteur (n = 297)                   |               |   | 1 run / sem  |

### ❖ ARN

*ArcherDx™*

- |   |   |                  |
|---|---|------------------|
| - Transcrits de fusion : panel « Lung » (n = 645) | } | 1 à 2 runs / sem |
| - Transcrits de fusion : panel sarcome (n = 116)  |   |                  |

Technique Archer  
Pipeline commercial

## Biopsies liquides

### ❖ ADNtc (n = 520)

- |                                   |              |             |
|-----------------------------------|--------------|-------------|
| - Hotspot : ddCR                  |              | 1 run / sem |
| - Panel plus large : NGS (en dev) | <i>ctSOM</i> |             |

# Panels transcript de fusion : à Rennes et MTP

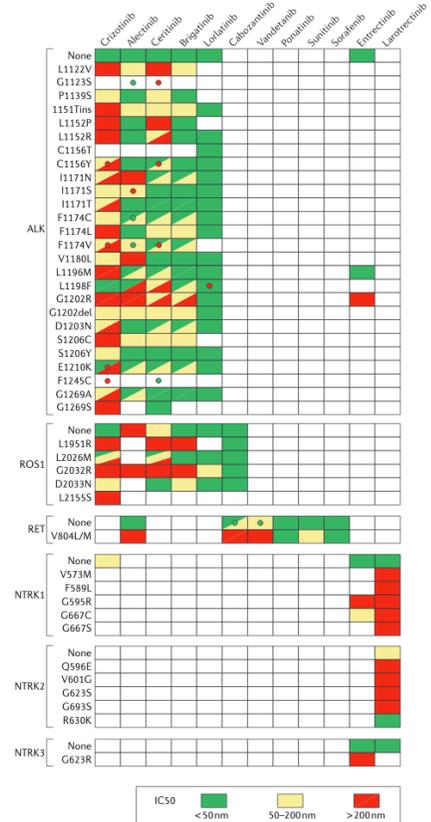
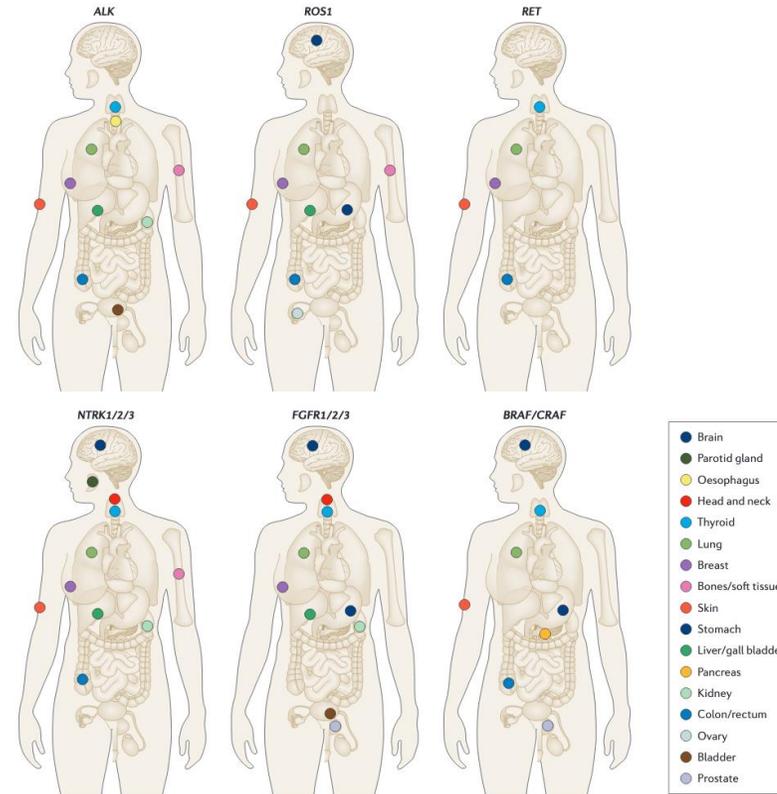
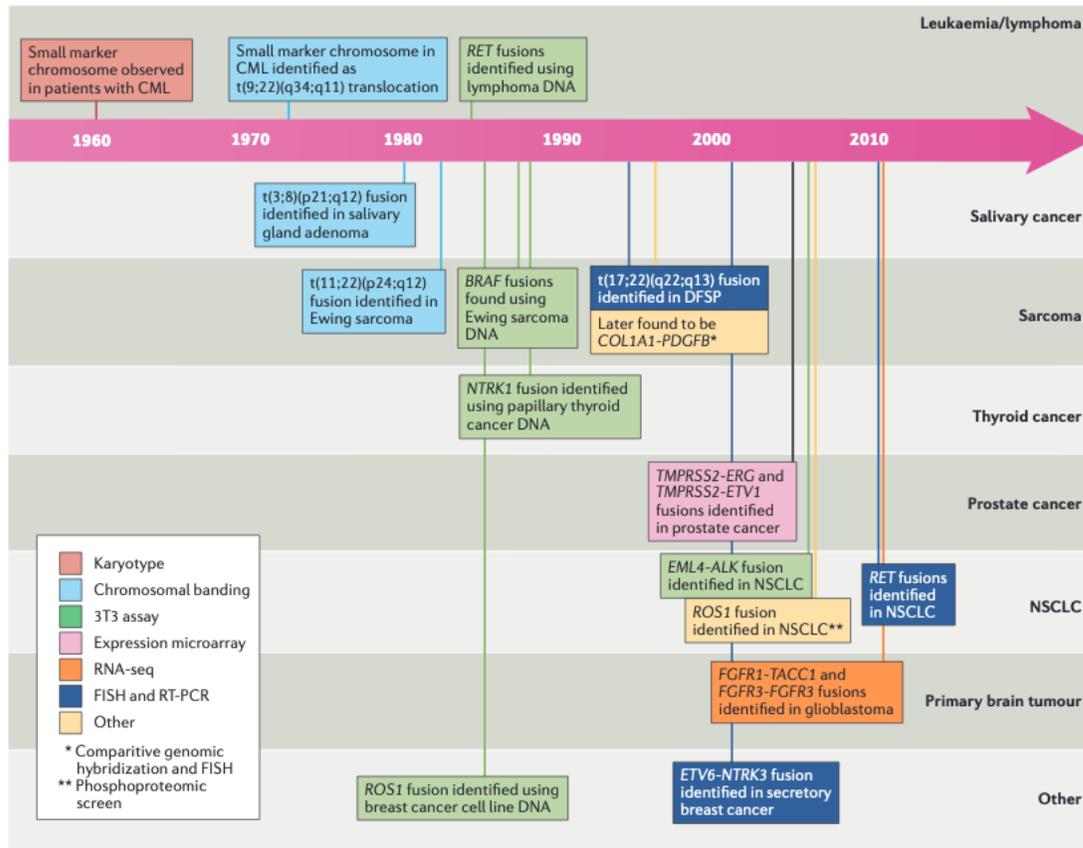
## **Panel FUSION lung (17 gènes)**

BRAF, ALK, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MET, NRG1, NRK1, NTRK2, NTRK3, NUTM1, PIK3CA, RET, ROS1

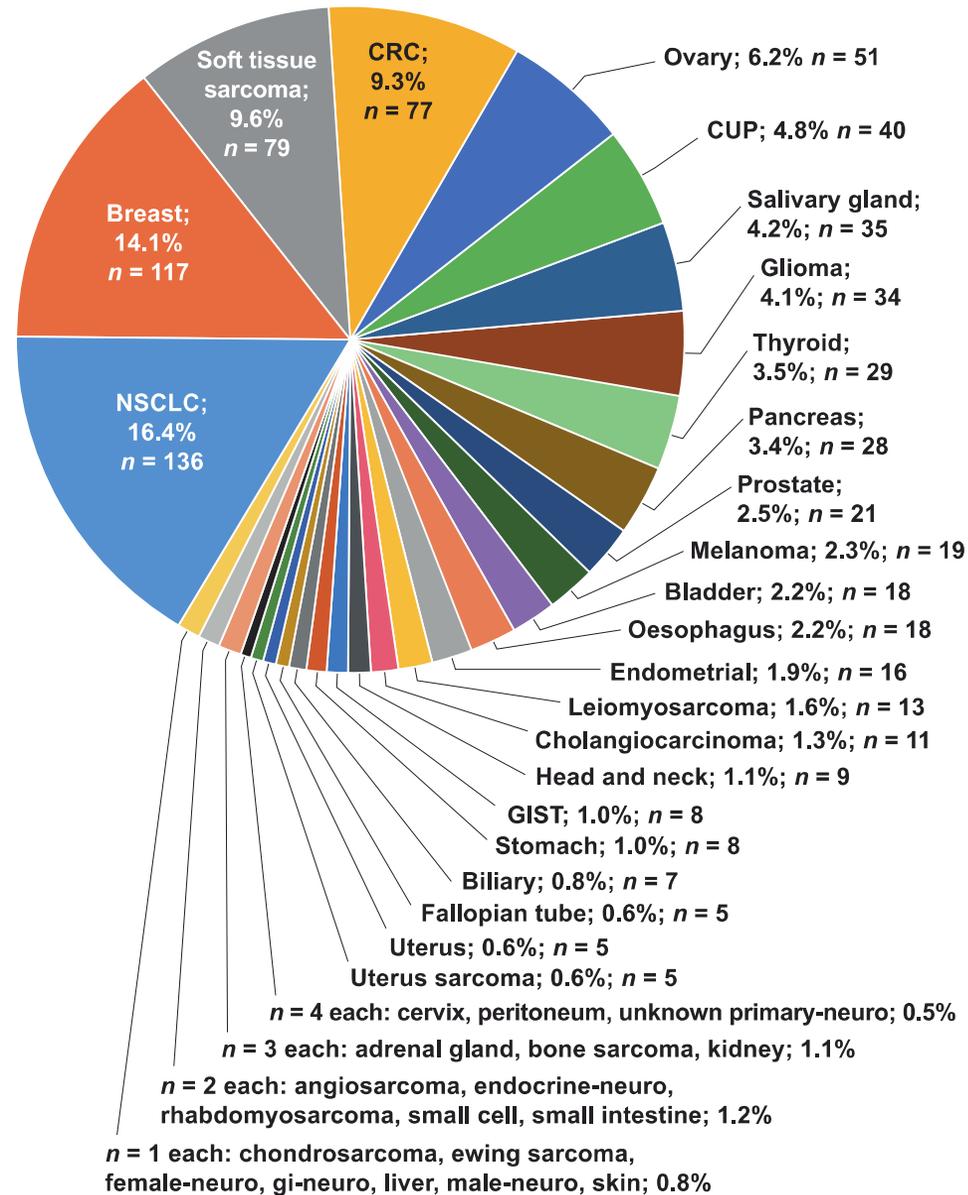
## **Panel FUSION sarcoma (63 gènes)**

BCOR, BRAF, CAMTA1, CCNB3, CIC, CSF1, CTNNB1, EGFR, EPC1, ERG, ESR1, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EWSR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FOS, FOSB, FOXO1, FUS, GLI1, HMGA2, JAZF1, MBTD1, MDM2, MEAF6, MET, MGEA5, MKL2, MYOD1, NCOA1, NCOA2, NCOA3, NR4A3, NTRK1, NTRK2, NTRK3, NUTM1, PAX3, PDGFB, PDGFRA, PHF1, PALG1, PRKCA, PRKCB, PRKCD, RAF1, RET, ROS1, SS18, STAT6, TAF15, TCF12, TFE3, TFG, USP6, VGLL2, YAP1, YWHAE

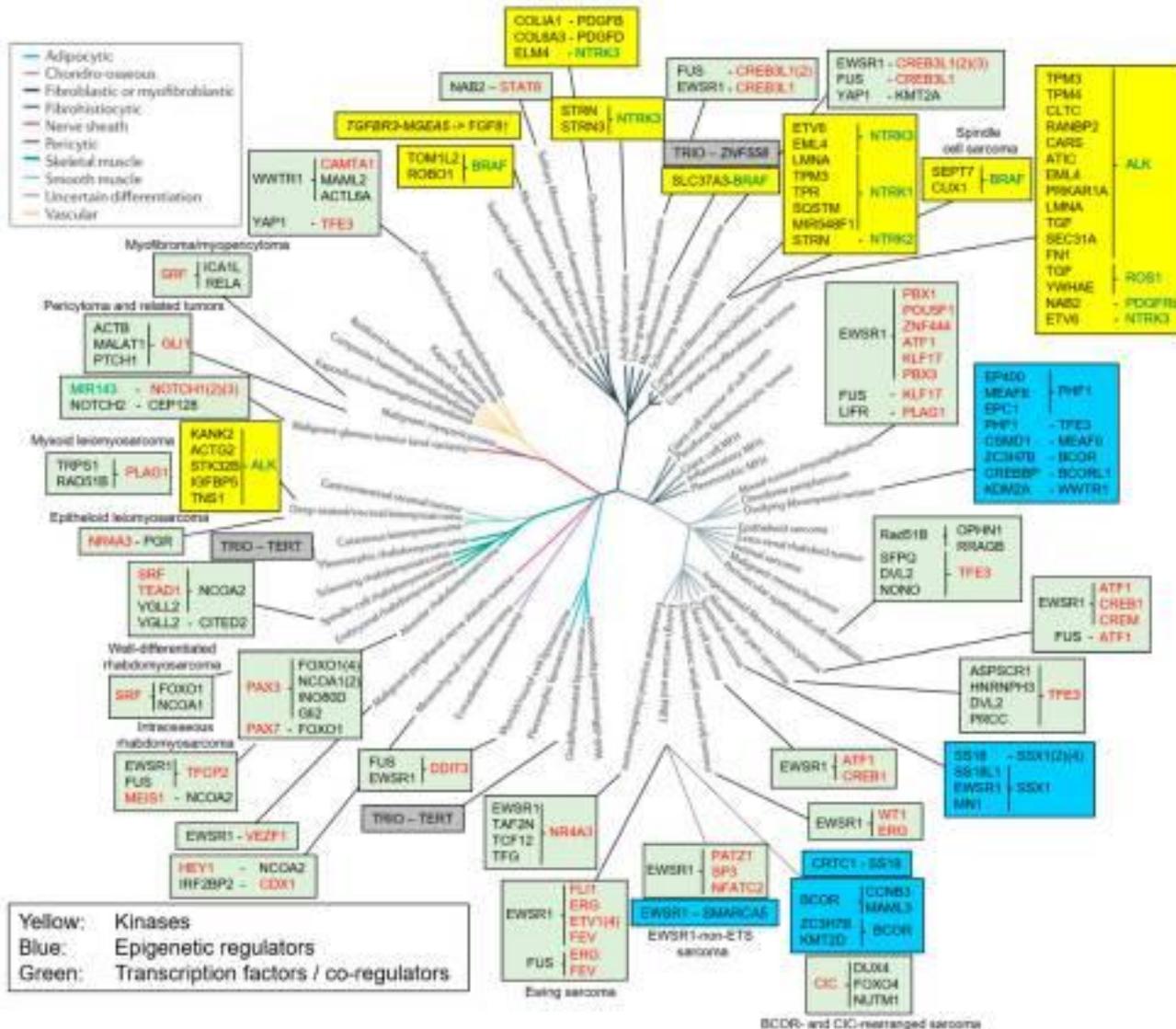
# Génes de fusion dans les tumeurs solides



# Fusions NTRK?



# Classification moléculaire des Sarcomes



Environ 40 % de tous les sarcomes sont déterminés par l'un des 100 gènes de fusion connues.

1<sup>er</sup> intention: RNA ciblé  
 2<sup>eme</sup> intention: RNAseq si RNA ciblé négatif

=> A visée diagnostique en complémentarité de paramètres cliniques, morphologiques et biologiques

# Présentation des activités d'oncogénétique somatique

## Prélèvements tissulaires

### ❖ ADN

- SNV, indels (panel 53 gènes) (n = 2472)

*AdiVar*

- CNV (n = 751)

*MIAMs*

- Instabilité microsatellitaire (n = 572)

*ifCNV*

} 2 runs / sem

- Altérations gènes voie HR, MMR (n = 353)

*Oryci*

- Instabilité génomique (score HRD) (n = 135)

*sWGS*

} 1 run / 15 j

- Gain et perte de copie de gènes : CGHarray (n = 284)

1 run / sem

- Méthylation de promoteur (n = 297)

1 run / sem

Technique Juno  
Pipelines maison

### ❖ ARN

*ArcherDx™*

- Transcrits de fusion : panel « Lung » (n = 645)

- Transcrits de fusion : panel sarcome (n = 116)

} 1 à 2 runs / sem

## Biopsies liquides

### ❖ ADNtc (n = 520)

- Hotspot : ddCR

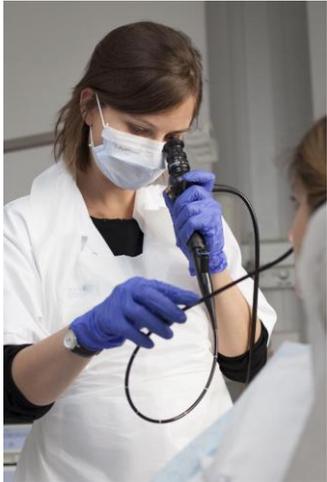
1 run / sem

- Panel plus large : NGS (en dev) *ctSOM*

# Les prélèvements tissulaires

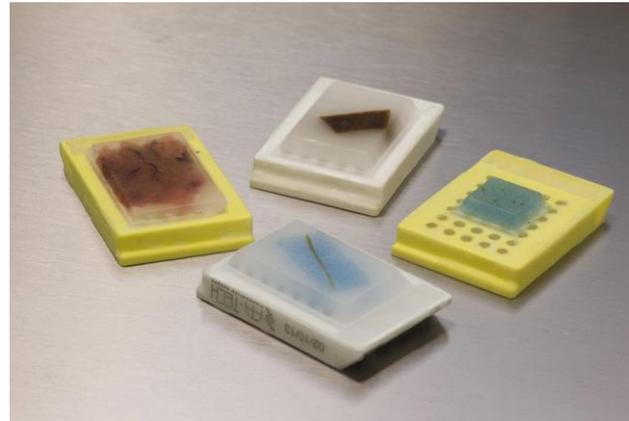
# Prélèvements tissulaires : Circuit du prélèvement en amont

## Obtention du prélèvement



- Fibroscopie
- Ponction sous scanner
- Aspiration
- Chirurgie...

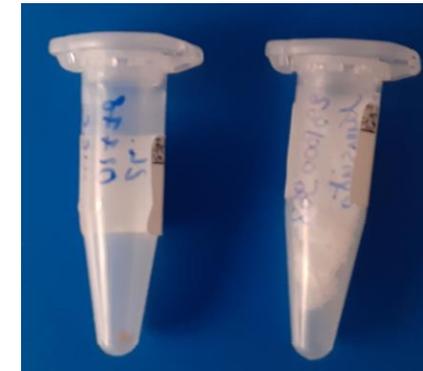
## Transmission au laboratoire d'anatomo-pathologie



## Inclusion en paraffine

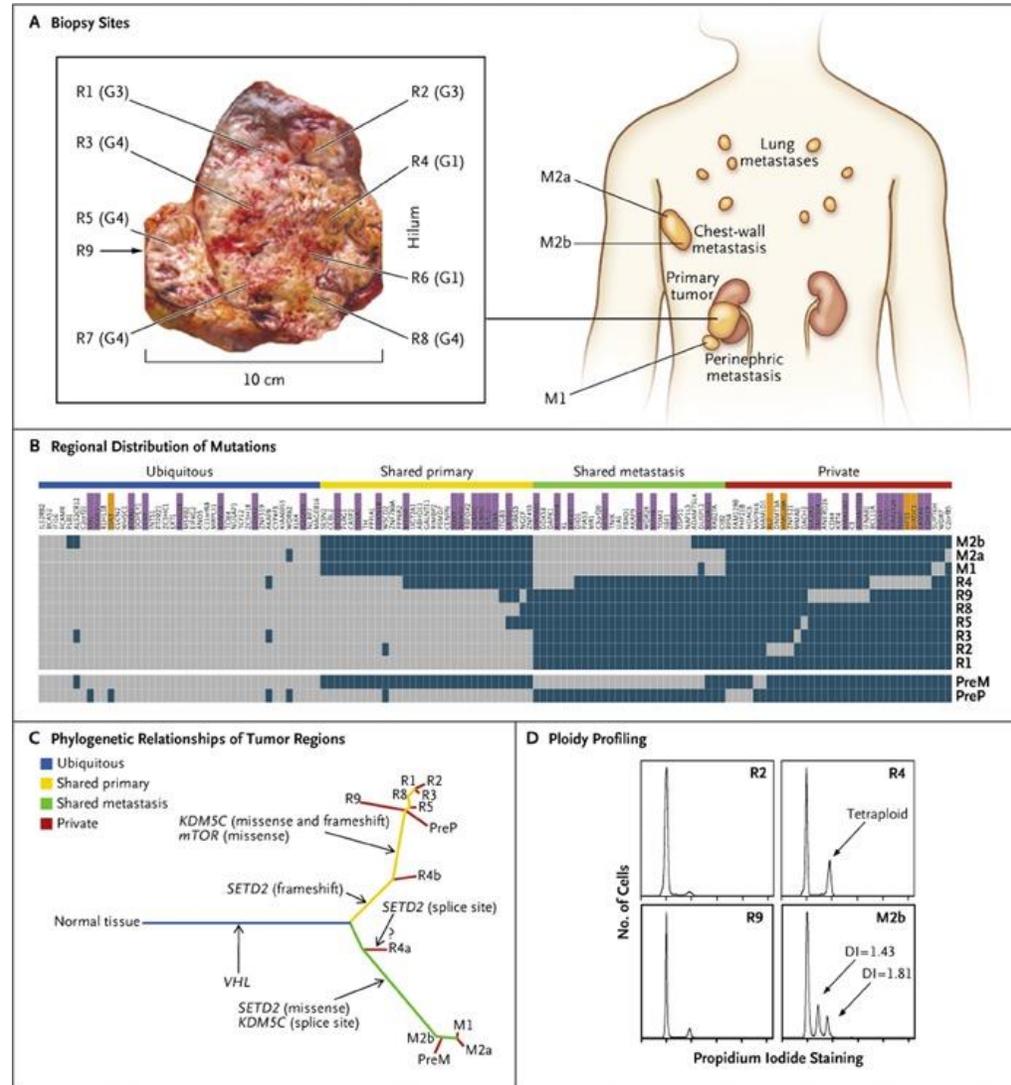
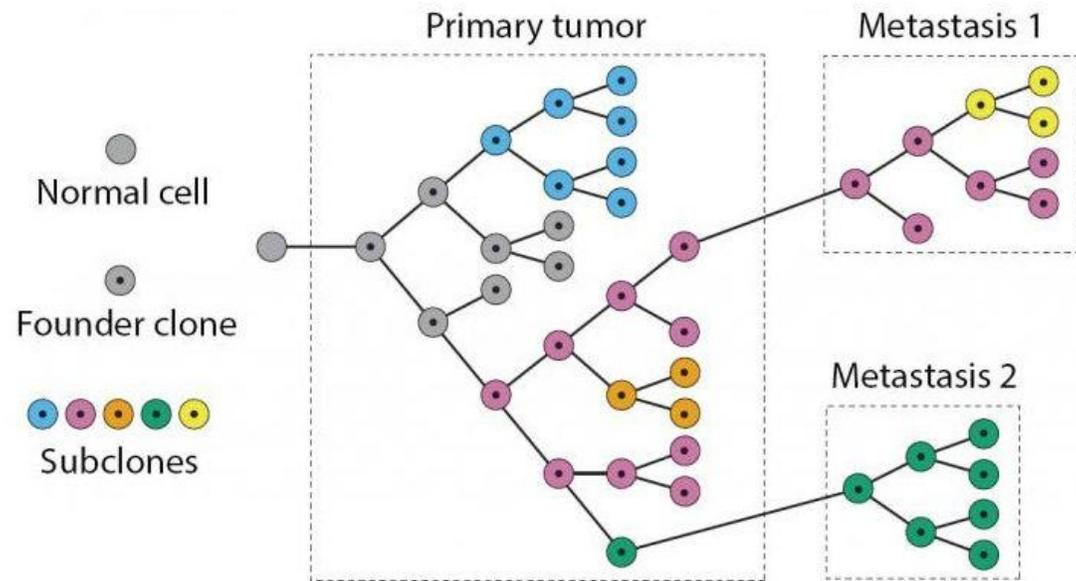
Cerclage de la zone tumorale après coloration à l'hématoxyline-éosine

## Transmission au labo de BioMol



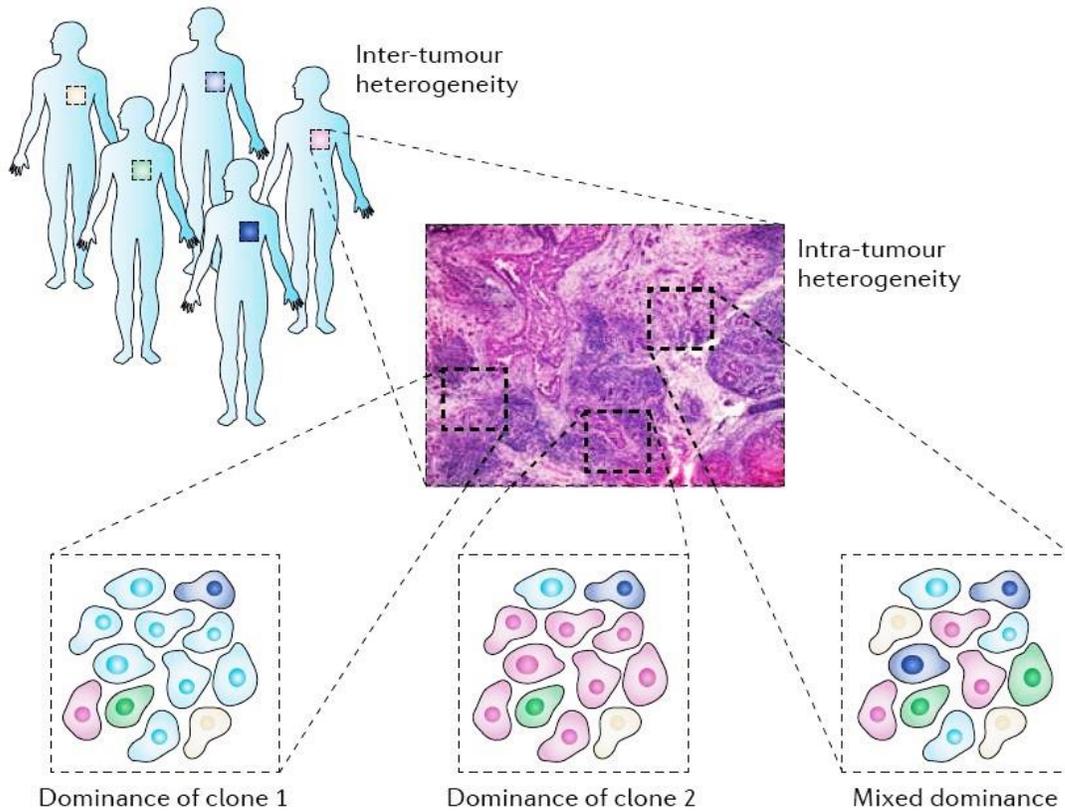
- Copeaux
- Macrodissection
- Carotte (punch)

# Prélèvements tissulaires : Prélèvement hétérogène



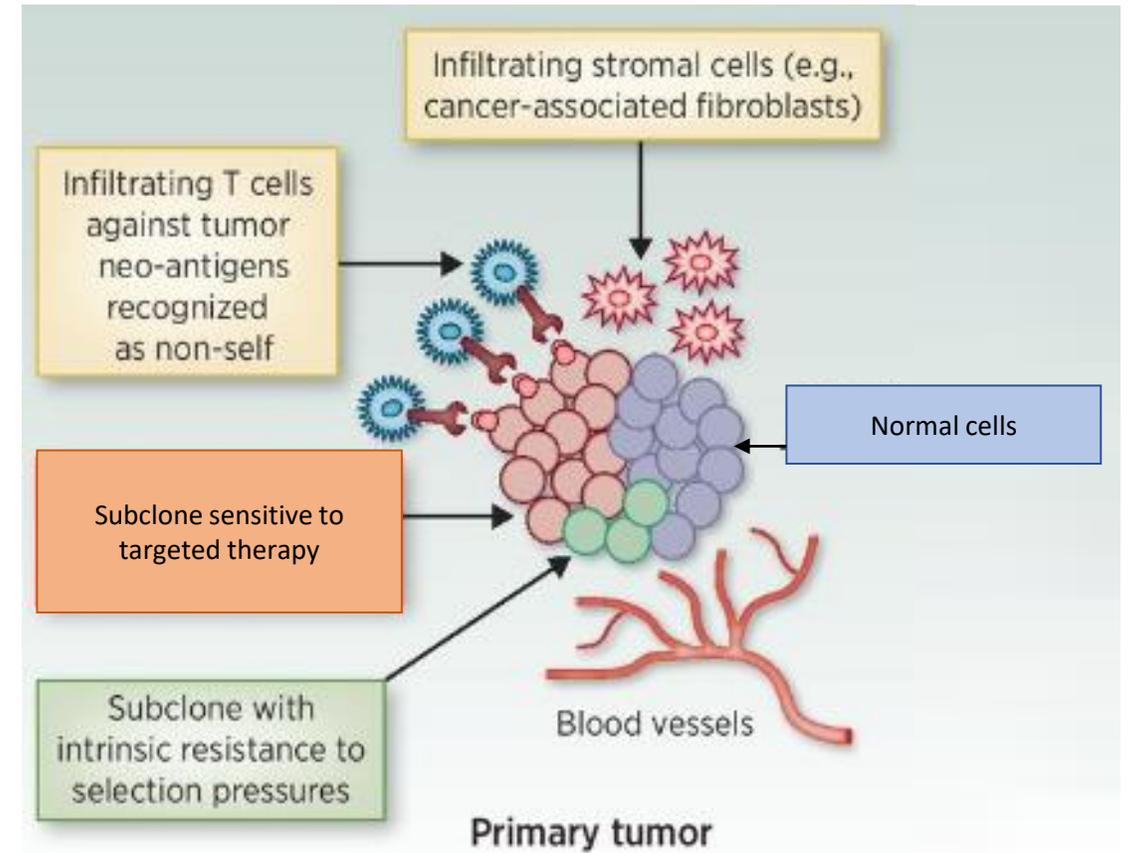
# Prélèvements tissulaires : Prélèvement hétérogène

✓ Tissu hétérogène



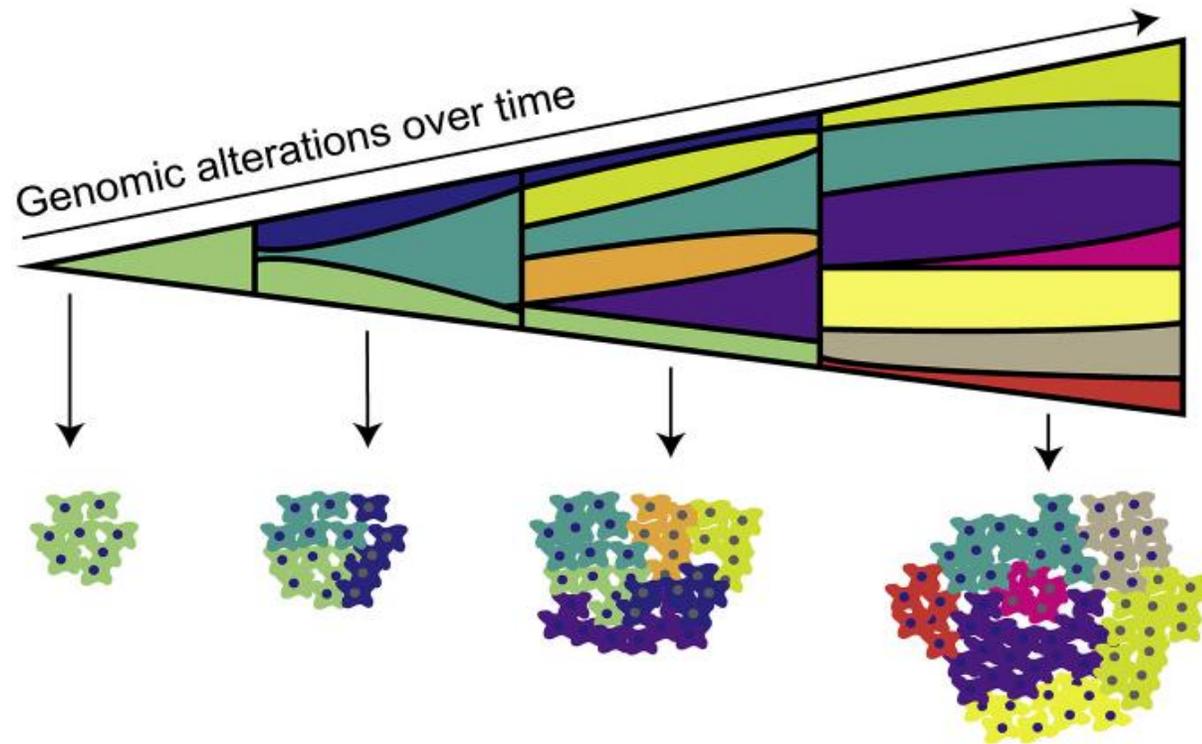
Jamal-Hanjani et al. *NEJM* 2017

✓ « Contaminé » par des cellules non tumorales



# L'importance du prélèvement

- ✓ Evolue au cours du temps et sous pression médicamenteuse



→ Nécessité de re-biopsier quand possible  
ou d'utiliser d'autres matrices (ADNct)

Savoir à quel moment du parcours de soin  
a été réalisé le prélèvement

# Exemples de prélèvements tissulaires

## ❖ Pièce opératoire



30% cellules tum



70% cellules tum

## ❖ Biopsie



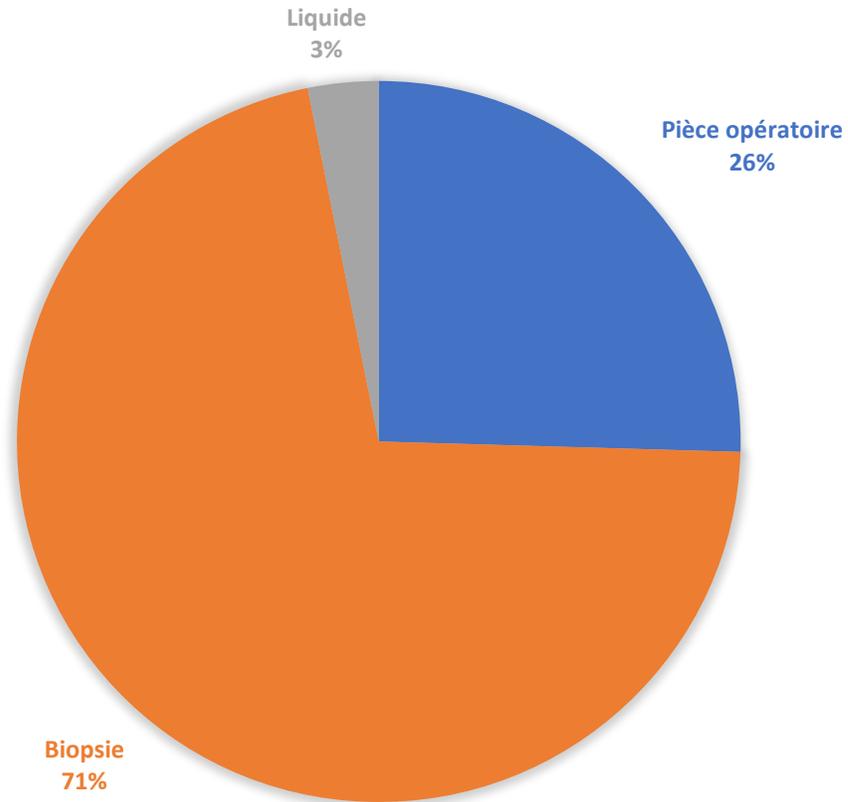
40% cellules tum

## Selon l'échantillon :

- Contamination avec du tissu non tumoral
- Paraffine perturbe l'extraction d'Ac nucléique
- Faible quantité de matériel disponible
- Nécrose

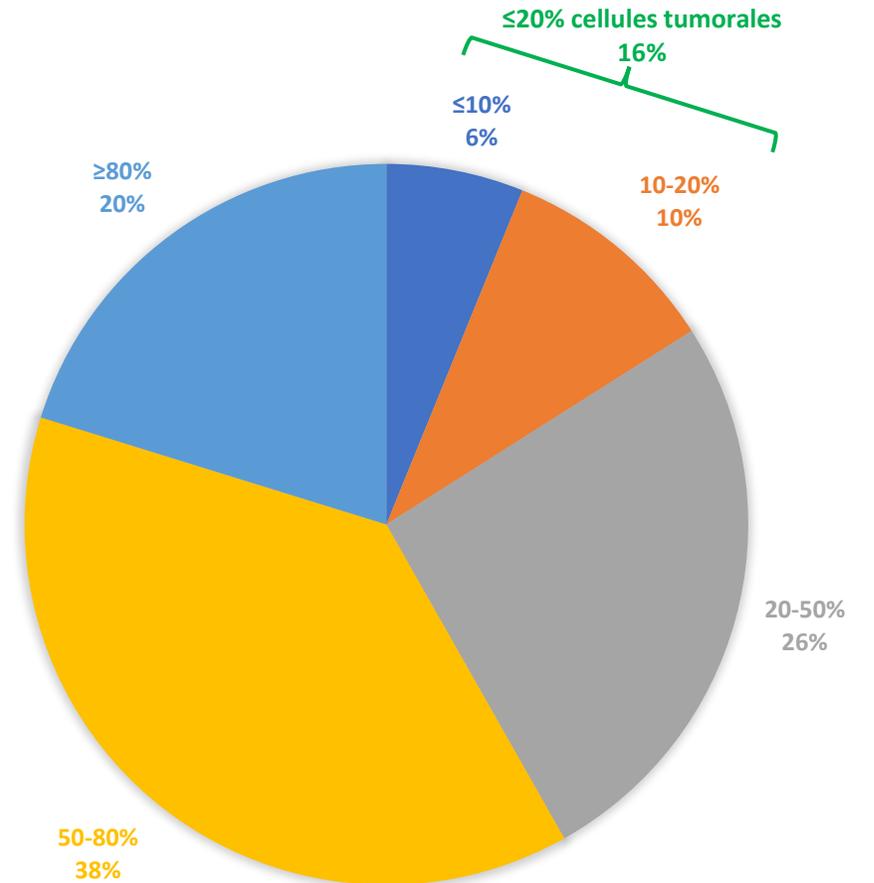
# Quelques chiffres

## ❖ Type de prélèvements réceptionnés



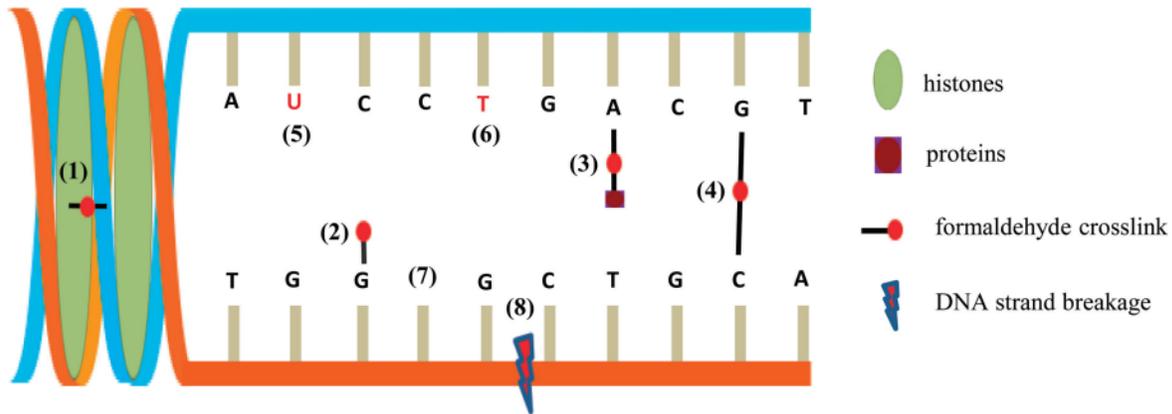
## ❖ Pourcentage de cellules tumorales

(Recommandé : > 20% cellules tumorales)



# Problème de l'inclusion en paraffine

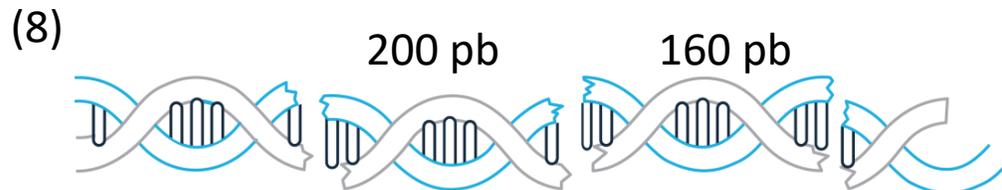
## ❖ La fixation au formol induit différents dommages au niveau des Ac nucléiques



(Do and Dobrovic, 2015)

- |   |                                  |
|---|----------------------------------|
| (1) Liaisons covalentes ADN-histones      | ADN non amplifiable              |
| (2) Formation d'adduits ADN-Formaldehyde  |                                  |
| (3) Liaisons covalentes ADN-proteines     |                                  |
| (4) Liaisons covalentes ADN-ADN           |                                  |
| (5-6) Déamination des cytosines           | Augmente la détection d'artéfact |
| (7) Perte de bases d'ADN                  |                                  |
| (8) Fragmentation de l'ADN (150 à 220 pb) |                                  |

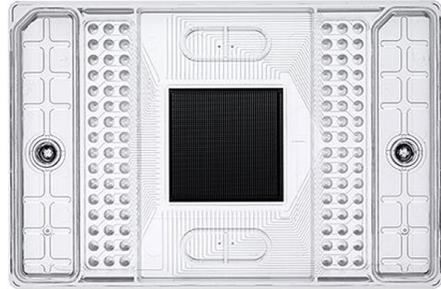
↑ Nécessité d'adapter les techniques



NB: Prélèvements osseux  
nécessite décalcification -> dégradation ++++

# La technique Juno et les pipelines associés

# Recherche d'altérations à partir d'ADN : Technique Juno



## ❖ Avantages de cette technique :

- Panel modulable
- Nécessite peu de quantité d'ADN (recommandé 20 ng, possible  $\geq 12.5$  ng DNA)
- Temps technique réduit (1,5 j pour Prep librairie)
- Technique amplicon : plus adaptée aux échantillons dégradés et avec peu d'ADN
- Indexage réalisée lors de la PCR

## ❖ Panel INCa\_v3



53 target genes | 243 kb | 1508 amplicons  
~19,000 pathogenic COSMIC IDs | >35,000 total COSMIC IDs



**Système Juno**

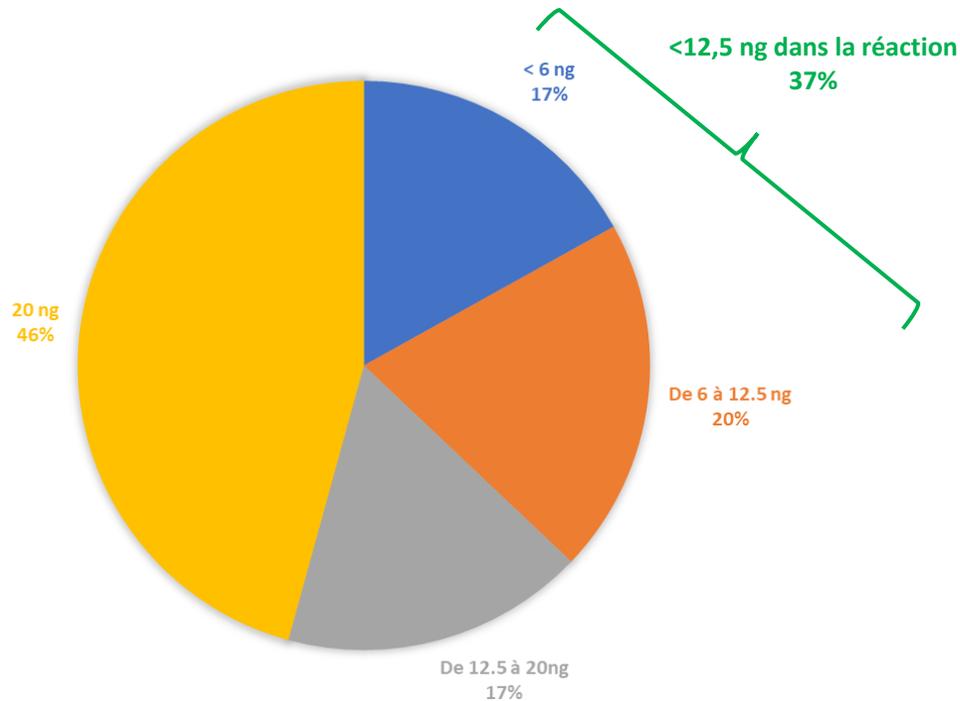
31 genes actionable hot spots	24 genes CNV targets	20 genes full-length coding DNA sequence
AKT1, BRAF, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, FGFR2, FGFR3, FOXL2, GNA11, GNAQ, GNAS, H3F3A, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3, MET, MITF, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAC1, ROS1, SMAD4, TYRP1	AKT1, ALK, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, HRAS, KIT, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RAC1, RB1, RET, RICTOR, TERT, TYRP1, VHL	ALK, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, DDR2, HIST1H3B, JAK1, JAK3, NF1, NOTCH1, PALB2, PTEN, RAD51C, RAD51D, RB1, RET, STK11, TERT, TP53, VHL

+ ajout de 8 loci microsatellites,

+ *H3F3B*

+ augmentation de la couverture pour les hotspots

# Recherche d'altérations à partir d'ADN : Technique Juno



**Rappel** : 16% ont  $\leq 20\%$  cellules tumorales

**Remarque** : ex. échantillon problématique

3 ng  $\leftrightarrow$  1000 Cellules

si 20% cellules tum  $\leftrightarrow$  200 cellules

Si hétérogénéité tum (mut à 50%)  $\leftrightarrow$  100 cellules

## ❖ Détails techniques

- Hotspots ciblés par deux amplicons chevauchants
- Double librairie pour minimiser l'impact de l'inclusion

## ❖ Altérations recherchées : pipelines maison

- SNV, indels : *AdiVar*
- Amplification de gènes (*MET*, *HER2*) : *ifCNV*
- Instabilité microsatellitaire : *MIAMs*

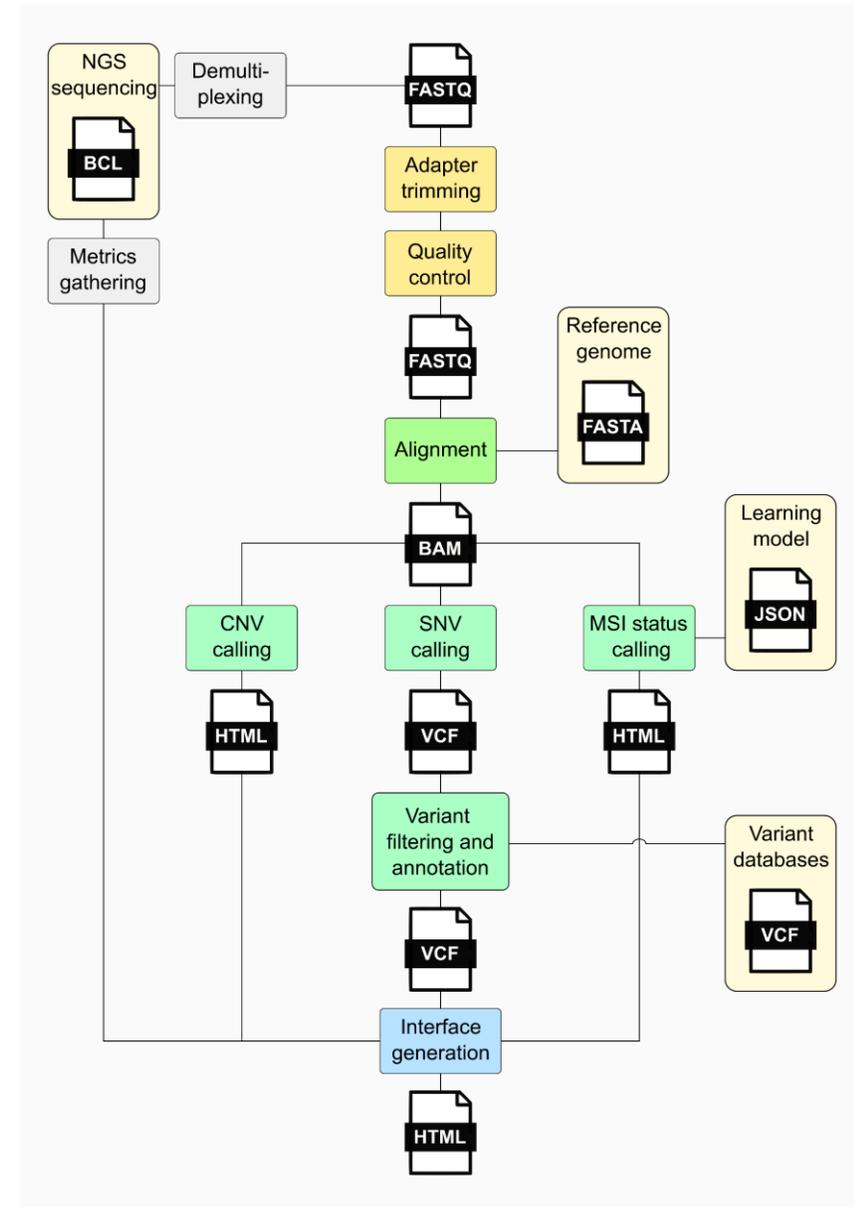
## ❖ Résultats :

Uniquement 5% échantillons rendus « non analysable »  
En général, parce qu'aucune mutation détectée

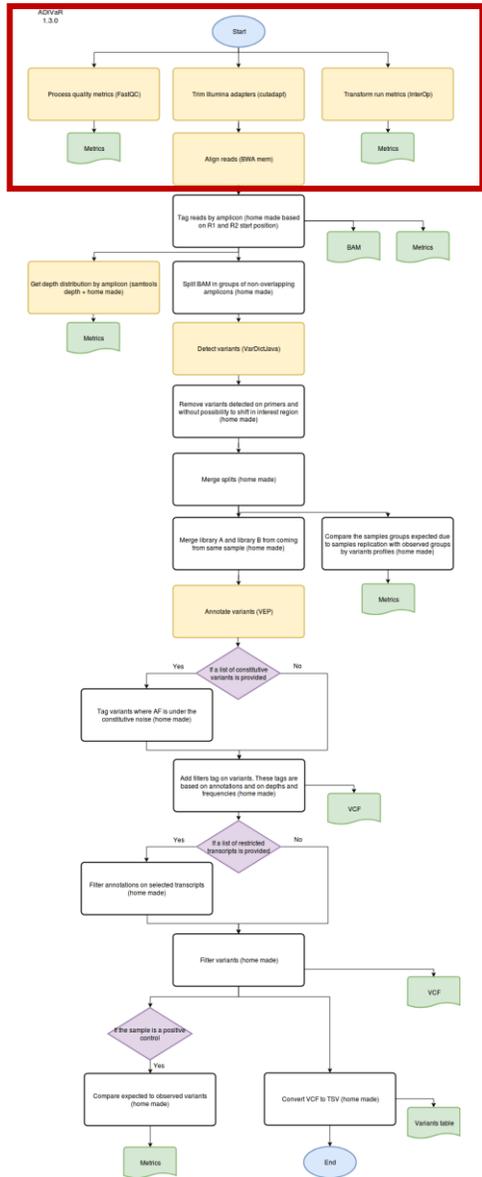
Remarque : 70% ont une quantité d'ADN < 3 ng

# Pipelines Bioinfo pour recherche altérations ADN

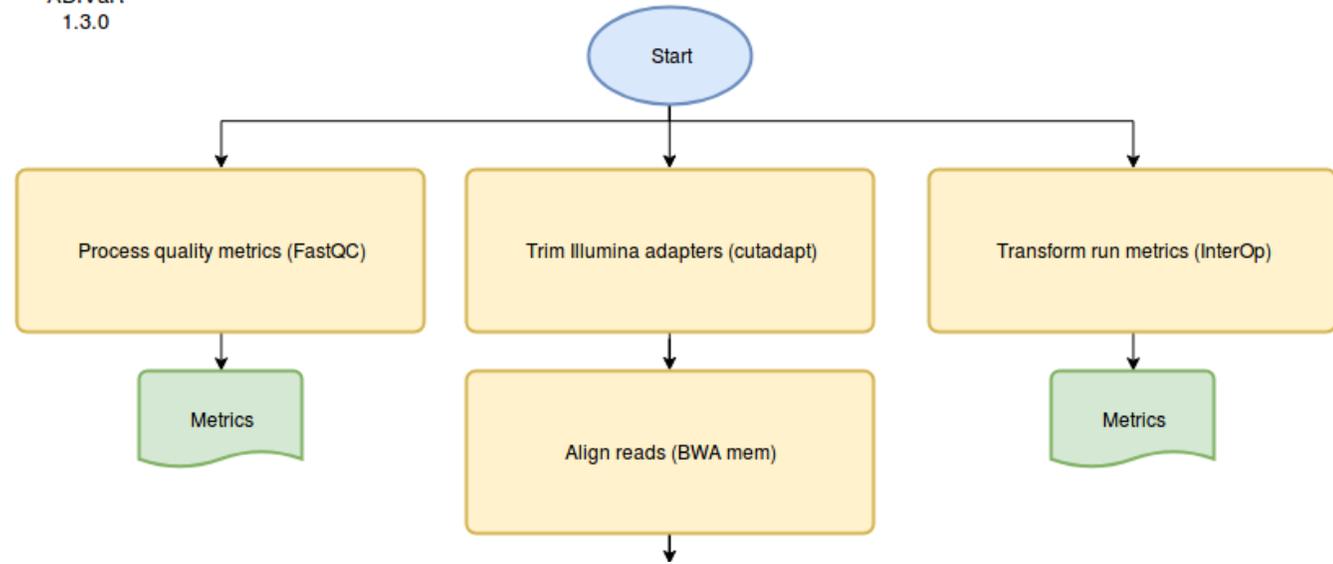
- ❖ Gestionnaire de workflow
- ❖ Rapide
- ❖ Double librairies
- ❖ Amplicons chevauchants
- ❖ Fiable
- ❖ Adapté à la technique et adaptable aux échantillons



# ADIVaR: A pipeline for SNV analysis

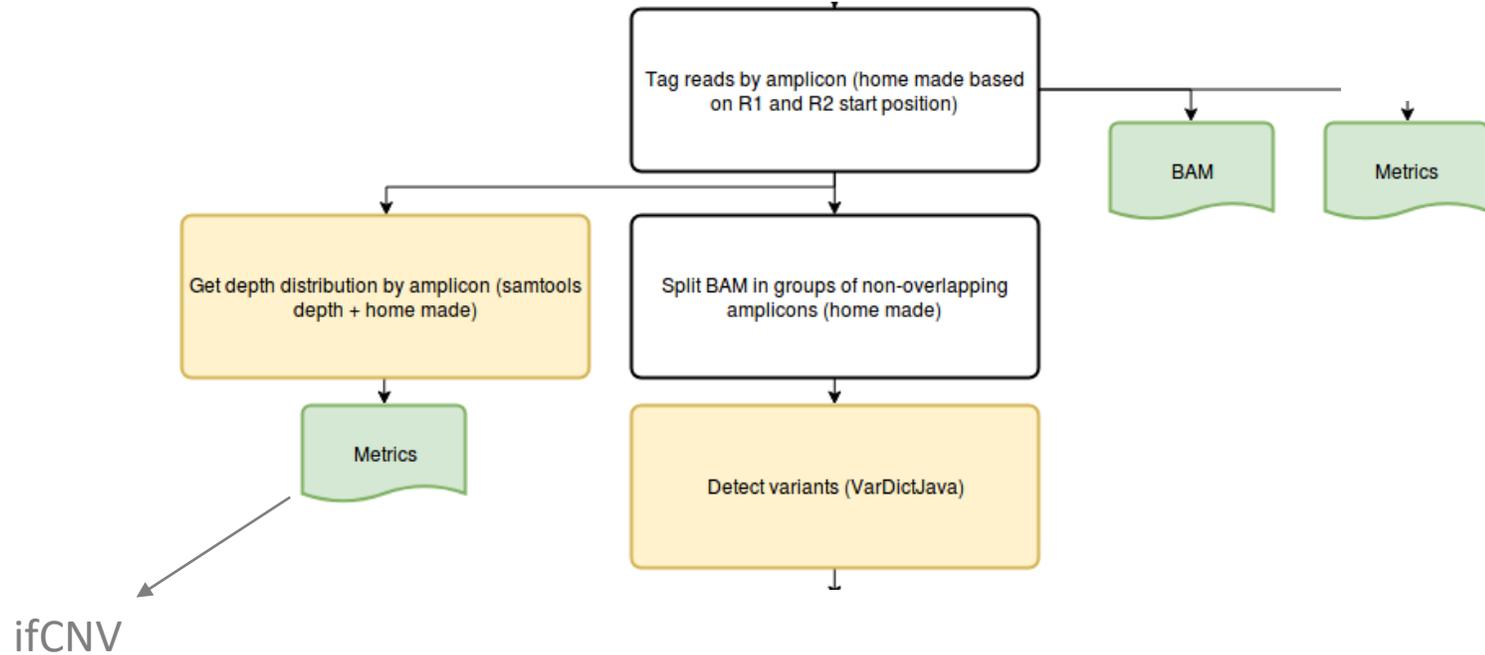
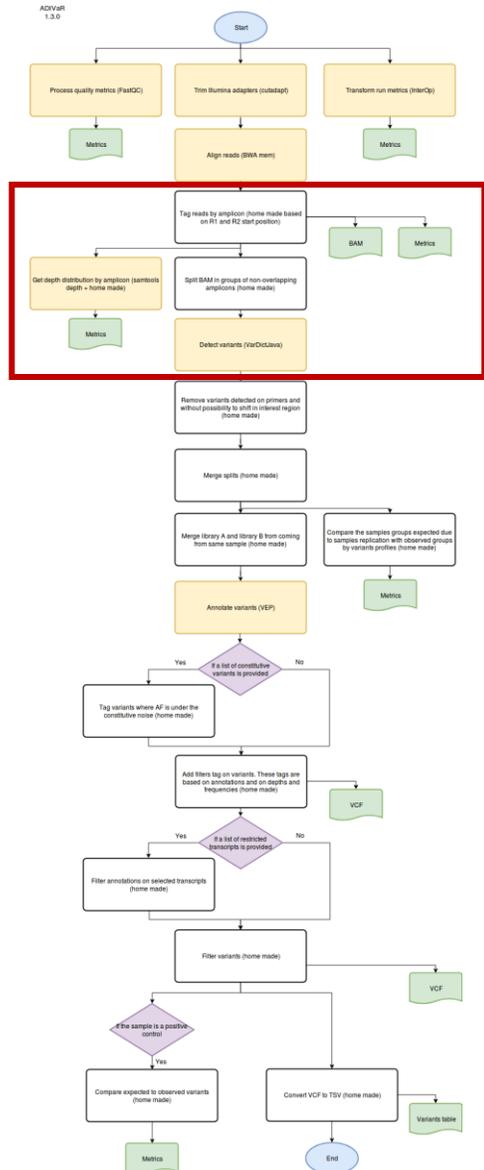


ADIVaR 1.3.0



Frederic Escudié (Toulouse)  
Charles Van Gothem (Montpellier)

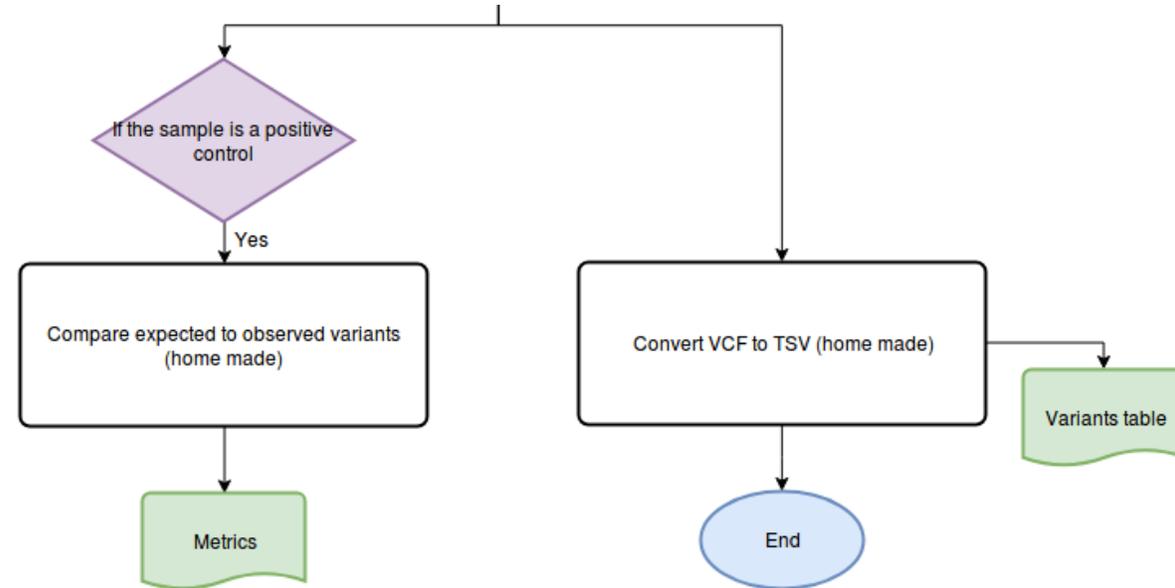
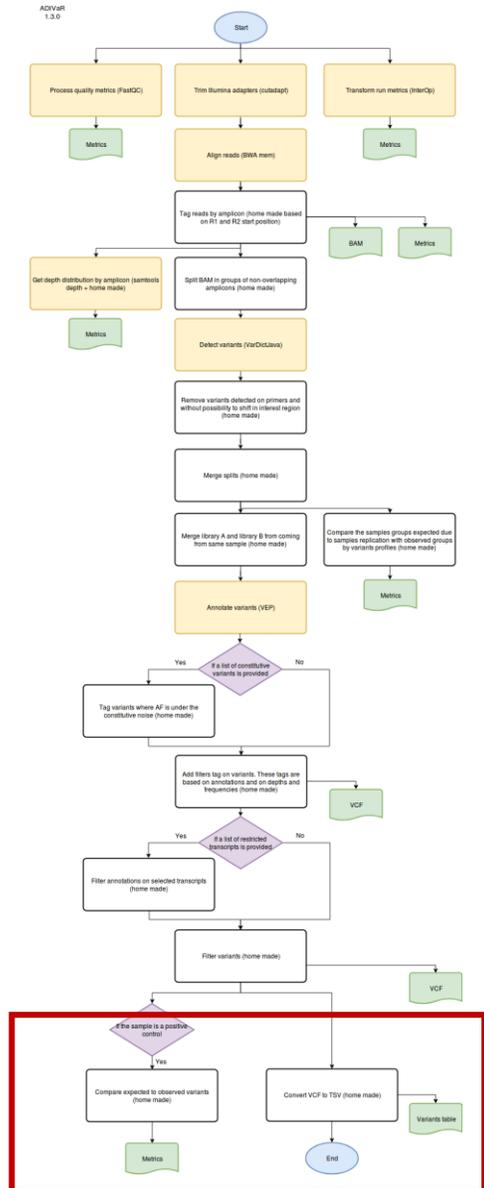
# ADIVaR: A pipeline for SNV analysis



Frederic Escudié (Toulouse)  
Charles Van Gothem (Montpellier)

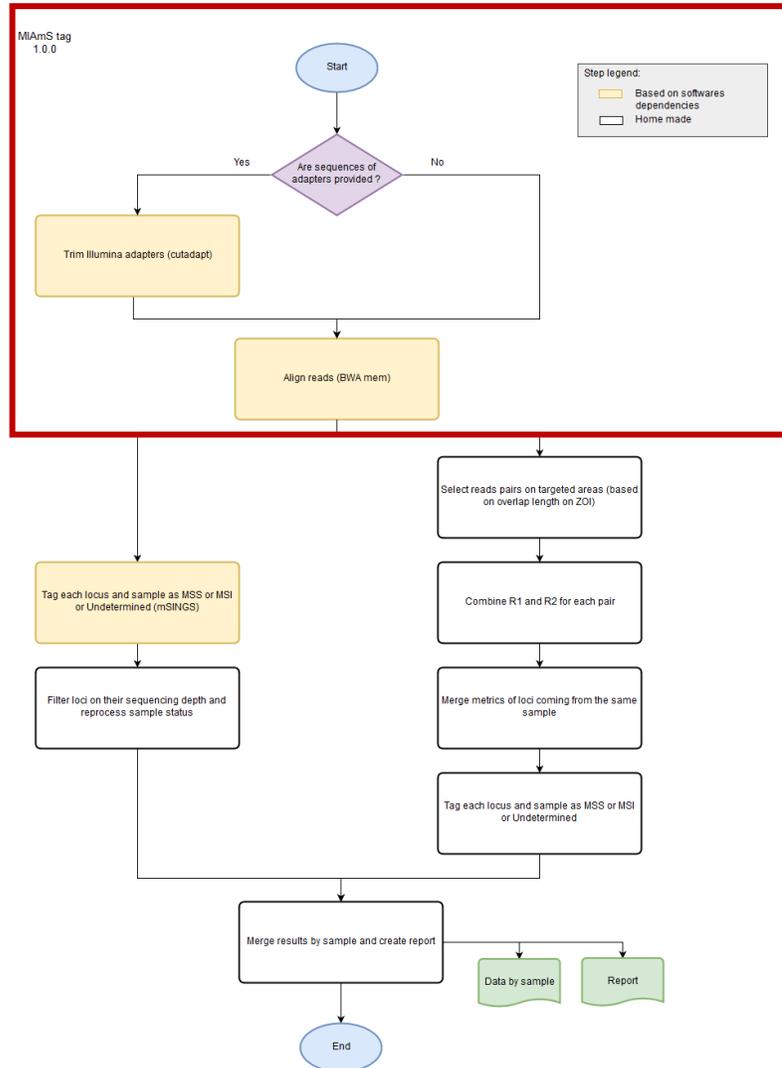


# ADIVaR: A pipeline for SNV analysis

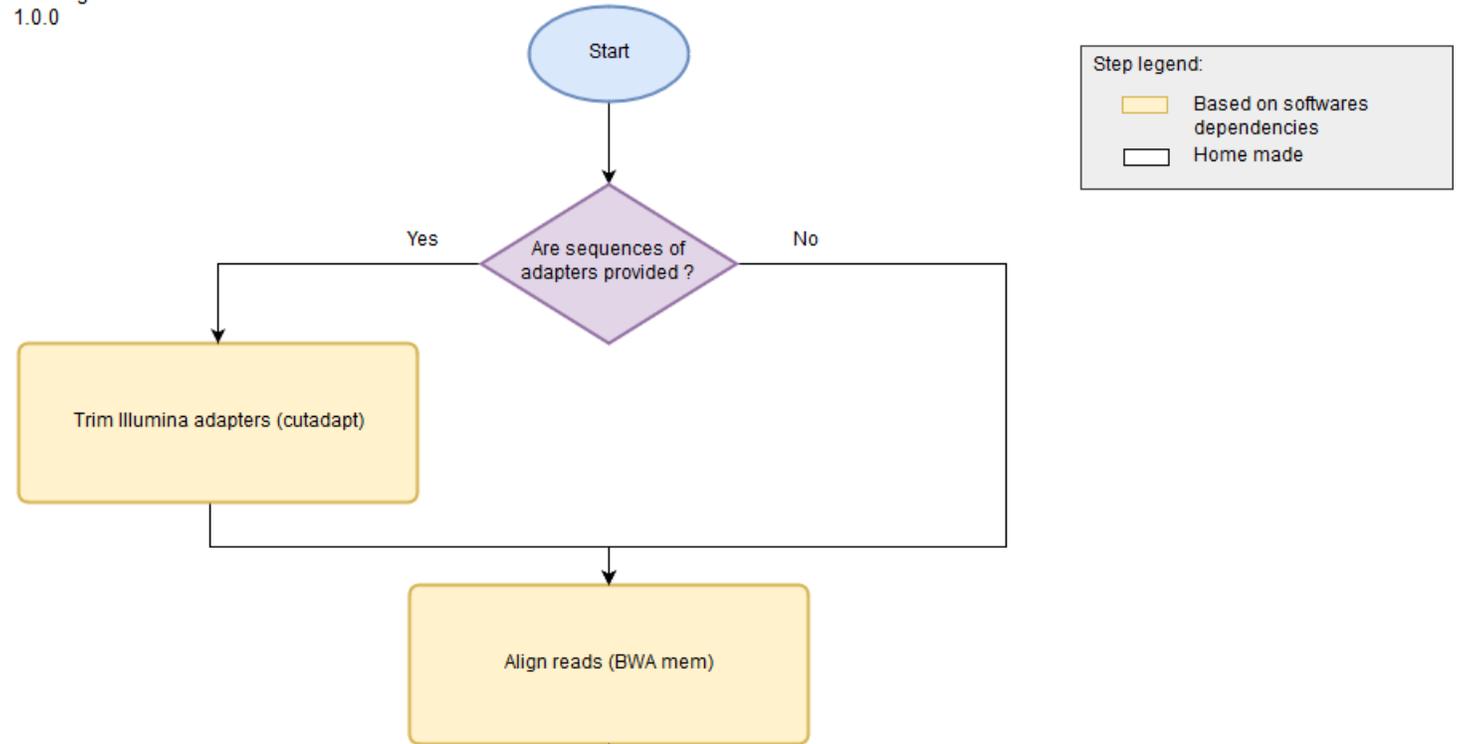


Frederic Escudié (Toulouse)  
Charles Van Gothem (Montpellier)

# MIAmS: Microsatellites Instability by Amplicon Sequencing

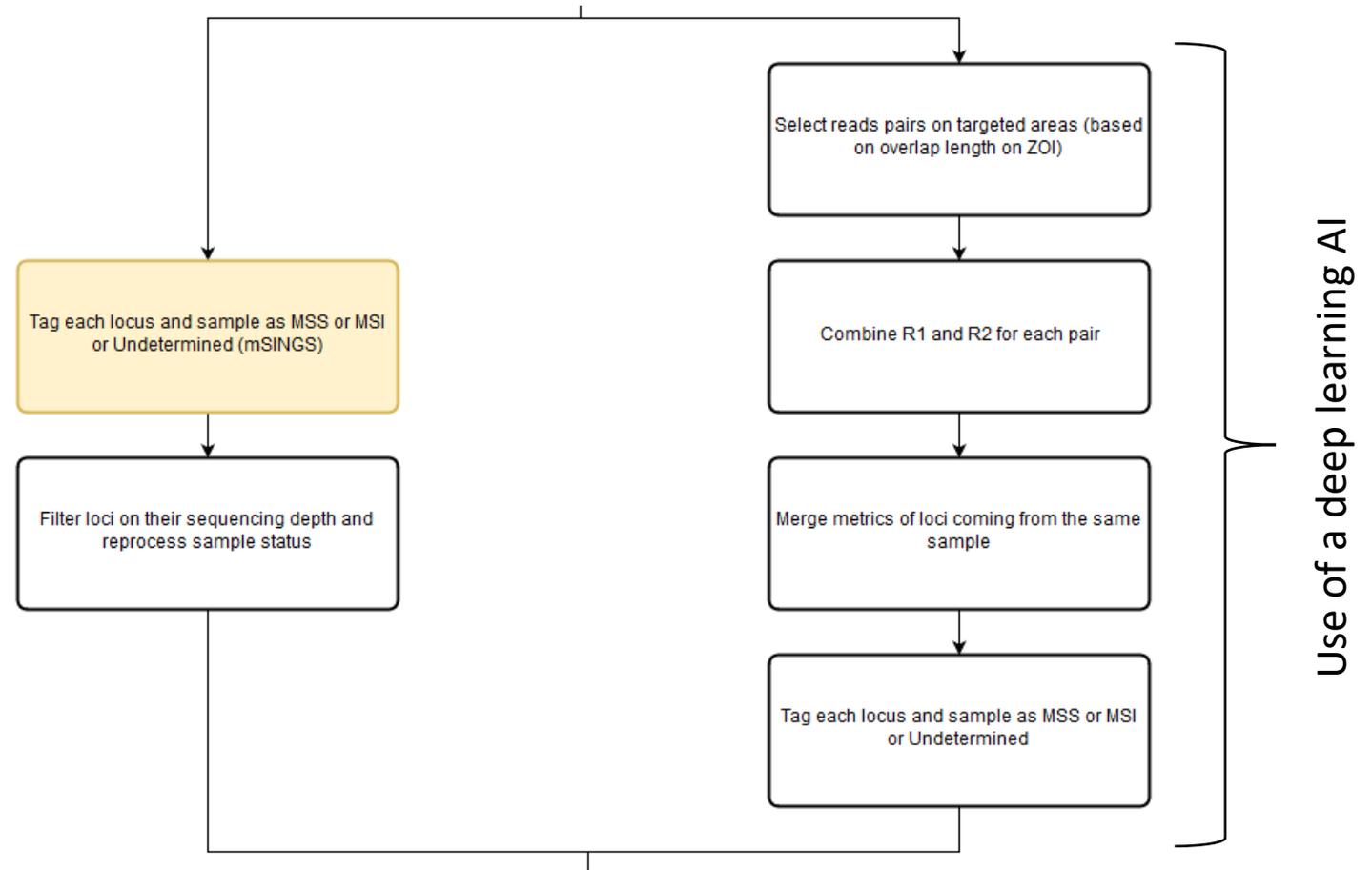
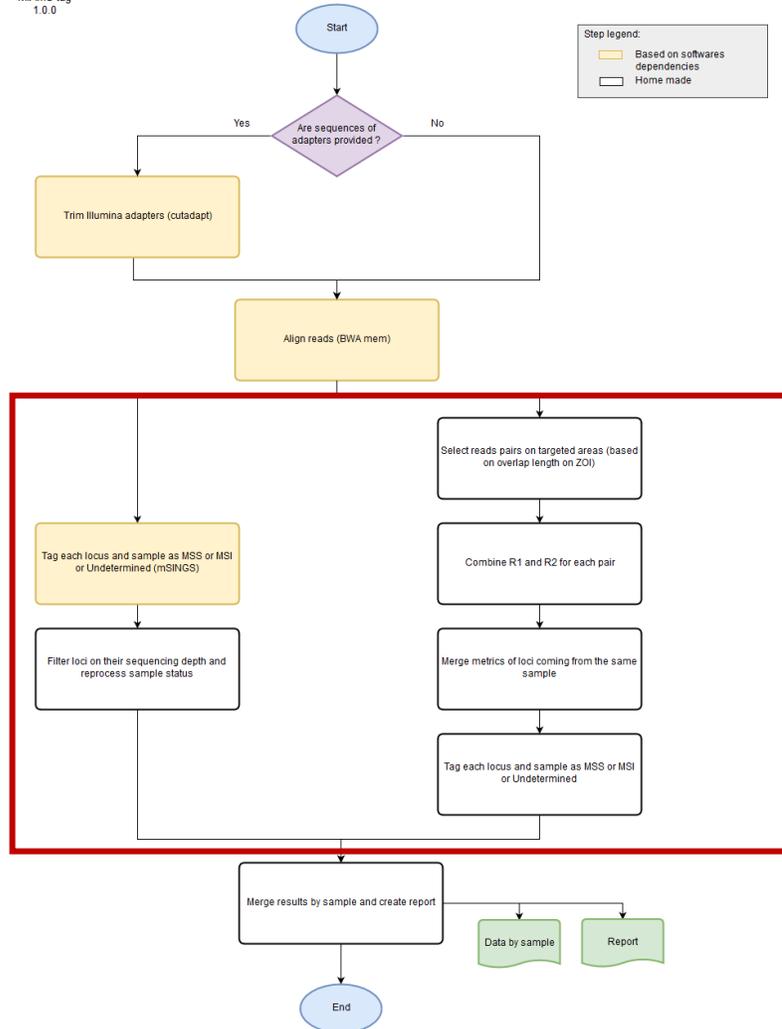


MIAmS tag 1.0.0



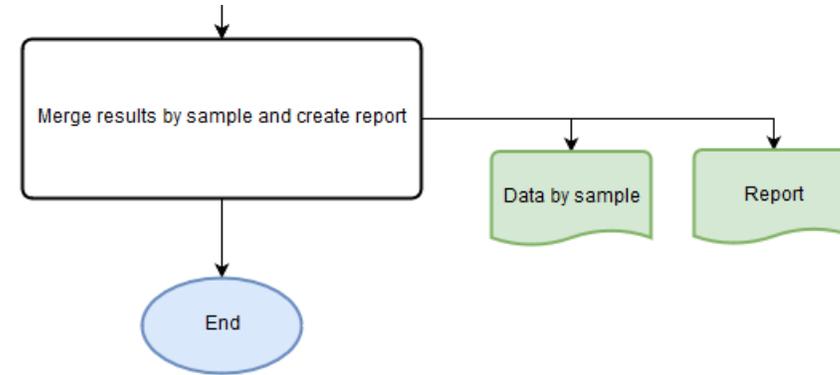
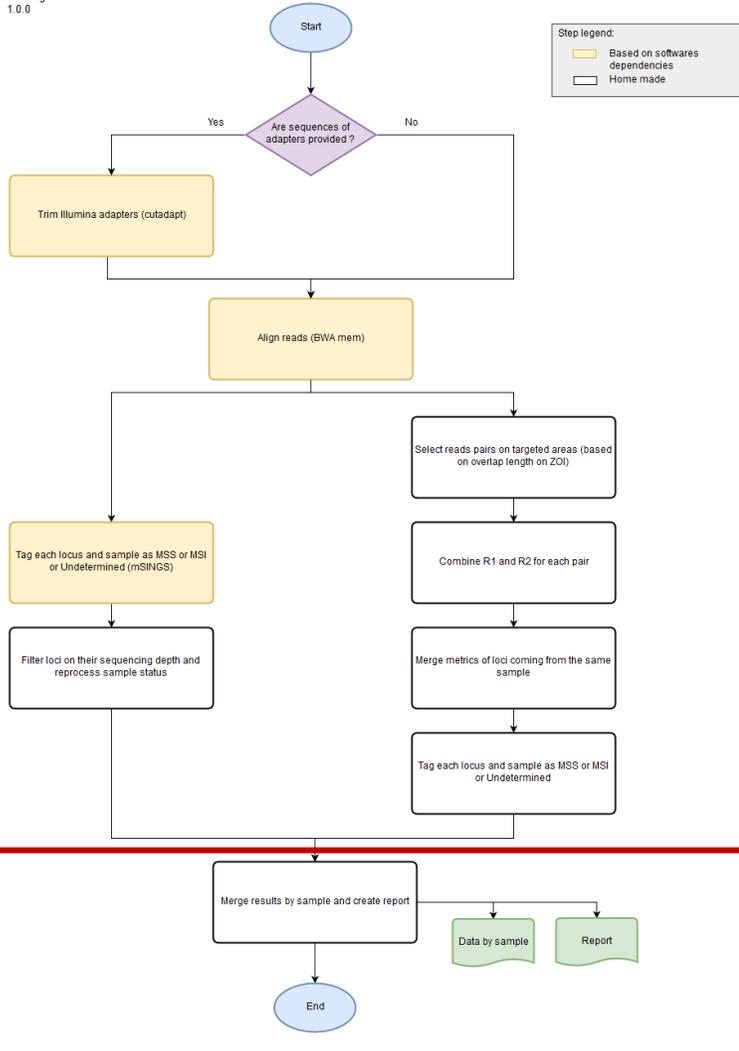
# MIAmS: Microsatellites Instability by Amplicon Sequencing

MIAmS tag  
1.0.0



# MIAmS: Microsatellites Instability by Amplicon Sequencing

MIAmS tag  
1.0.0

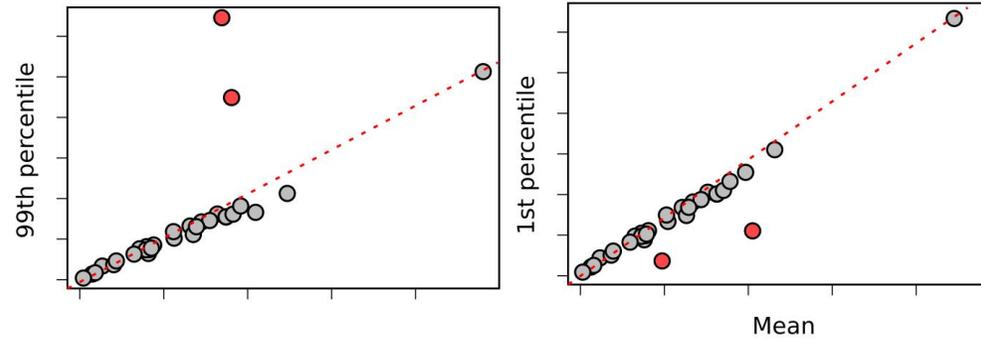
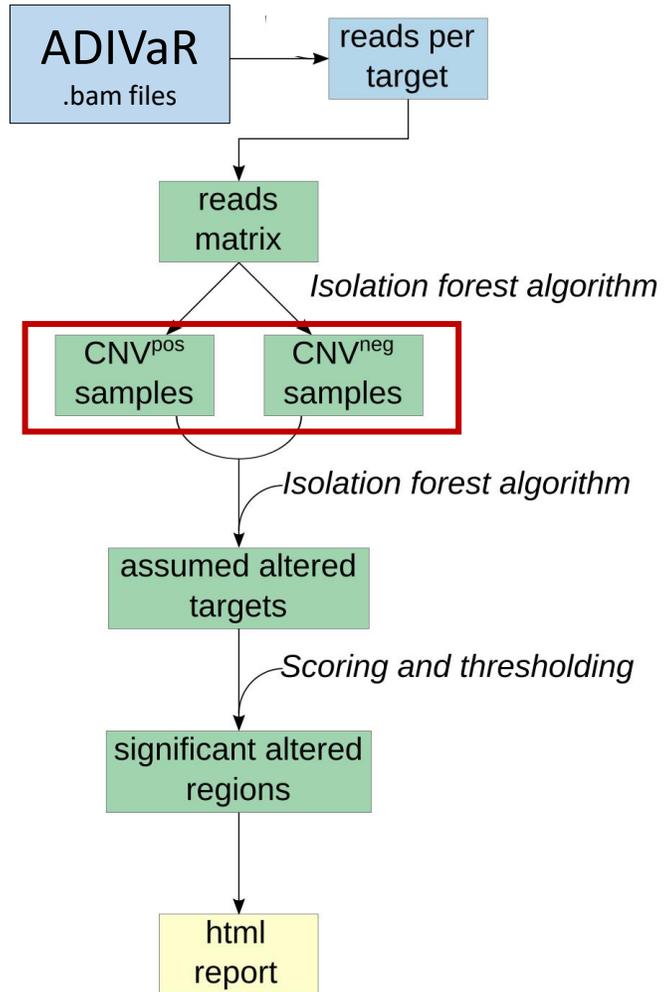


Uses 8 microsatellite loci

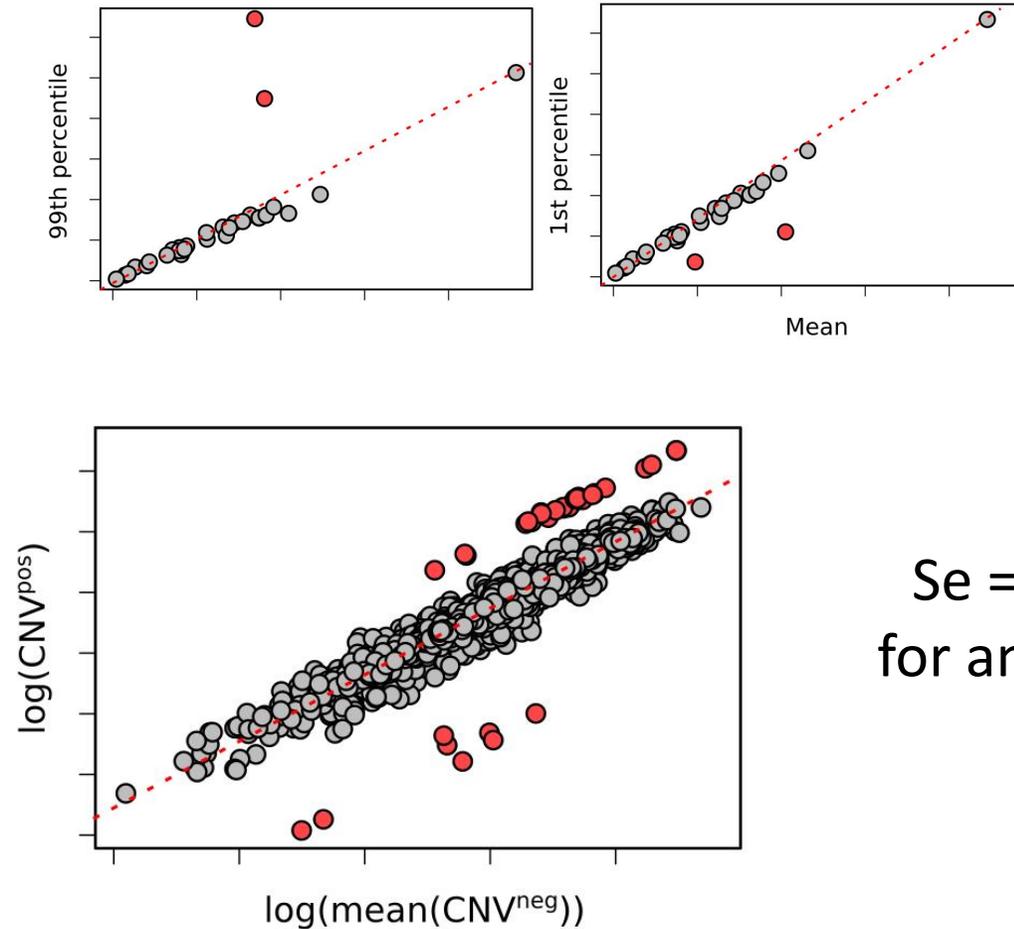
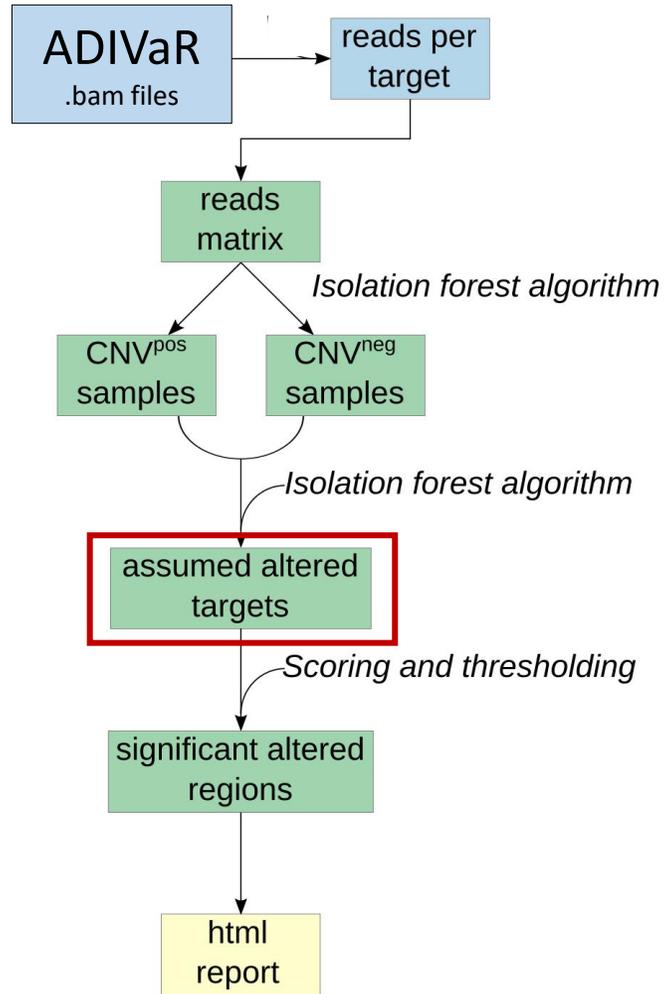
>100 samples from different tissues were used to train the model

Se and Sp > 0.95

# Détection de CNV : Développement de l'outil *ifCNV*



# Détection de CNV : Développement de l'outil *ifCNV*



Se = 1 & Sp = 1  
for amplifications

# Interfaces

- ❖ **Convivial**
- ❖ **Efficace**
- ❖ **Aide à l'interprétation : lien avec des bases des données**
- ❖ **Permettant le report des variants sans intervention manuelle**

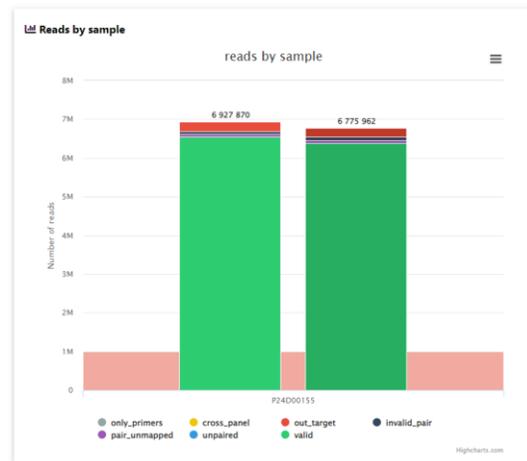


# Détection de SNV, indels (*AdiVar*) : quelques exemples

- ❖ Echantillon de bonne qualité :
  - 40% cellules tumorales
  - 15 ng dans la réaction

👤 P24D00207

📄 Summary



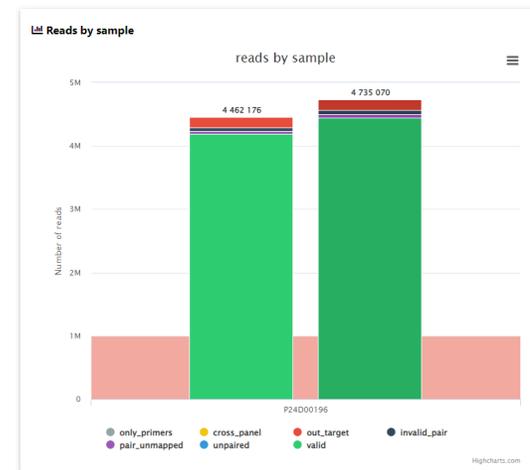
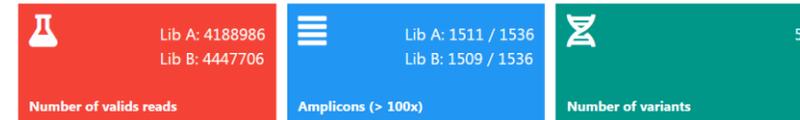
🔍 Variants

Sample name	Gene	Localisation	DNA position	Protein position (1 letter)	Protein position (3 letters)	VAF	Consequences	Filters	DP libA	DP libB
P24D00207	KRAS	Exon 2	c.35G>T	p.G12V	p.Gly12Val	9.69%	missense_variant	PASS	565/6678	742/6809

- ❖ Echantillon avec peu de cellules tumorales :
  - 15% cellules tumorales
  - 5 ng dans la réaction

👤 P24D00196

📄 Summary



Sample name	Gene	Localisation	DNA position	Protein position (1 letter)	Protein position (3 letters)	VAF	Consequences	Filters	DP libA	DP libB
P24D00196	KRAS	Exon 2	c.37G>T	p.G13C	p.Gly13Cys	3.89%	missense_variant	PASS	39/1995	122/2145
P24D00196	CDKN2A	Exon 2	c.194T>C	p.L65P	p.Leu65Pro	1.78%	missense_variant	PASS	7/399	4/220
P24D00196	ERBB2	Exon 20	c.2473T>C	p.W825R	p.Trp825Arg	1.59%	missense_variant	incomplete	1/90	3/162
P24D00196	MAP2K1	Exon 2	c.278T>C	p.V93A	p.Val93Ala	1.34%	missense_variant	incomplete	0/91	5/283
P24D00196	ERBB2	Intron 20	c.2493+6C>T	NA	NA	1.19%	splice_region_variant;intron_variant	incomplete	0/90	3/162

# Détection de SNV, indels (*AdiVar*) : quelques exemples

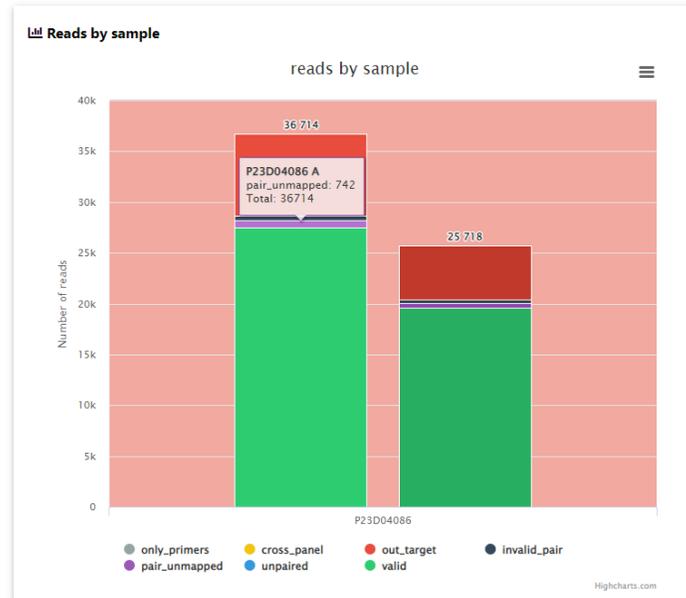
## ❖ ADN non amplifiable : dégradé ou cross-linké

70% cellules tumorales

17 ng dans la réaction

👤 P23D04086

### 📄 Summary



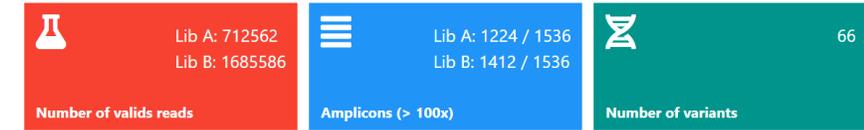
## ❖ Echantillon avec beaucoup d'artefacts d'inclusion :

70% cellules tumorales

20 ng dans la réaction

👤 D24D01345

### 📄 Summary



Sample name	Gene	Localisation	DNA position	Protein position (1 letter)	Protein position (3 letters)	VAF	Consequences	Filters	DP libA	DP libB
D24D01345	KRAS	Exon 2	c.35G>A	p.G12D	p.Gly12Asp	27.73%	missense_variant	PASS	164/774	726/2436
D24D01345	TP53	Exon 8	c.916C>T	p.R306*	p.Arg306Ter	24.19%	stop_gained	PASS	103/310	203/955
D24D01345	SMAD4	Exon 12	c.1595C>A	p.A532D	p.Ala532Asp	15.99%	missense_variant	incomplete	0/26	47/268
D24D01345	GNA11	Exon 4	c.553C>T	p.P185S	p.Pro185Ser	9.82%	missense_variant	incomplete	0/21	16/142
D24D01345	TP53	Intron 5	c.560-6T>C	NA	NA	9.69%	splice_region_variant;intron_variant	incomplete	25/187	0/71
D24D01345	TP53	Exon 6	c.568C>T	p.P190S	p.Pro190Ser	8.14%	missense_variant	incomplete	21/187	0/71
D24D01345	FGFR2	Exon 9	c.1210A>G	p.T404A	p.Thr404Ala	8.12%	missense_variant	incomplete	0/21	16/176
D24D01345	FGFR3	Exon 16	c.2101G>A	p.E701K	p.Glu701Lys	7.19%	missense_variant	incomplete	0/37	11/116
D24D01345	FGFR2	Exon 9	c.1147A>G	p.I383V	p.Ile383Val	6.32%	missense_variant	incomplete	0/21	12/169
D24D01345	STK11	Intron 2	c.375-5C>T	NA	NA	5.78%	splice_region_variant;intron_variant	incomplete	0/55	19/274
D24D01345	ALK	Intron 20	c.3359+7G>A	NA	NA	5.36%	splice_region_variant;intron_variant	incomplete	0/19	17/298
D24D01345	FGFR3	Exon 7	c.884G>A	p.G295D	p.Gly295Asp	5.15%	missense_variant	incomplete	0/66	22/361
D24D01345	CTNNB1	Exon 3	c.94G>A	p.D32N	p.Asp32Asn	4.68%	missense_variant	incomplete	0/84	19/322
D24D01345	EGFR	Intron 18	c.2184+8C>T	NA	NA	4.57%	splice_region_variant;intron_variant	PASS	26/257	8/487
D24D01345	FGFR3	Exon 7	c.877G>A	p.V293M	p.Val293Met	4.45%	missense_variant	incomplete	0/66	19/361
D24D01345	CDKN2A	Exon 2	c.283G>A	p.V95M	p.Val95Met	4.42%	missense_variant	incomplete	10/151	0/75
D24D01345	KIT	Exon 9	c.1427G>A	p.S476N	p.Ser476Asn	4.21%	missense_variant	incomplete	0/69	18/358
D24D01345	HRAS	Exon 4	c.310A>G	p.K104E	p.Lys104Glu	4.20%	missense_variant	incomplete	0/76	19/376

# Détermination du status MSI (MIAmS)

C22D00335\_S31\_L001

Sample

MSS

Method	Score	Status
MSINGS	0.875	MSS
SVCPairs	0.825	MSS

Locs

Fragments lengths

● NR27  
 ● NR22  
 ● HT17  
 ● NR21  
 ● BAT26  
 ● NR24  
 ● BAT25  
 ● D5S346

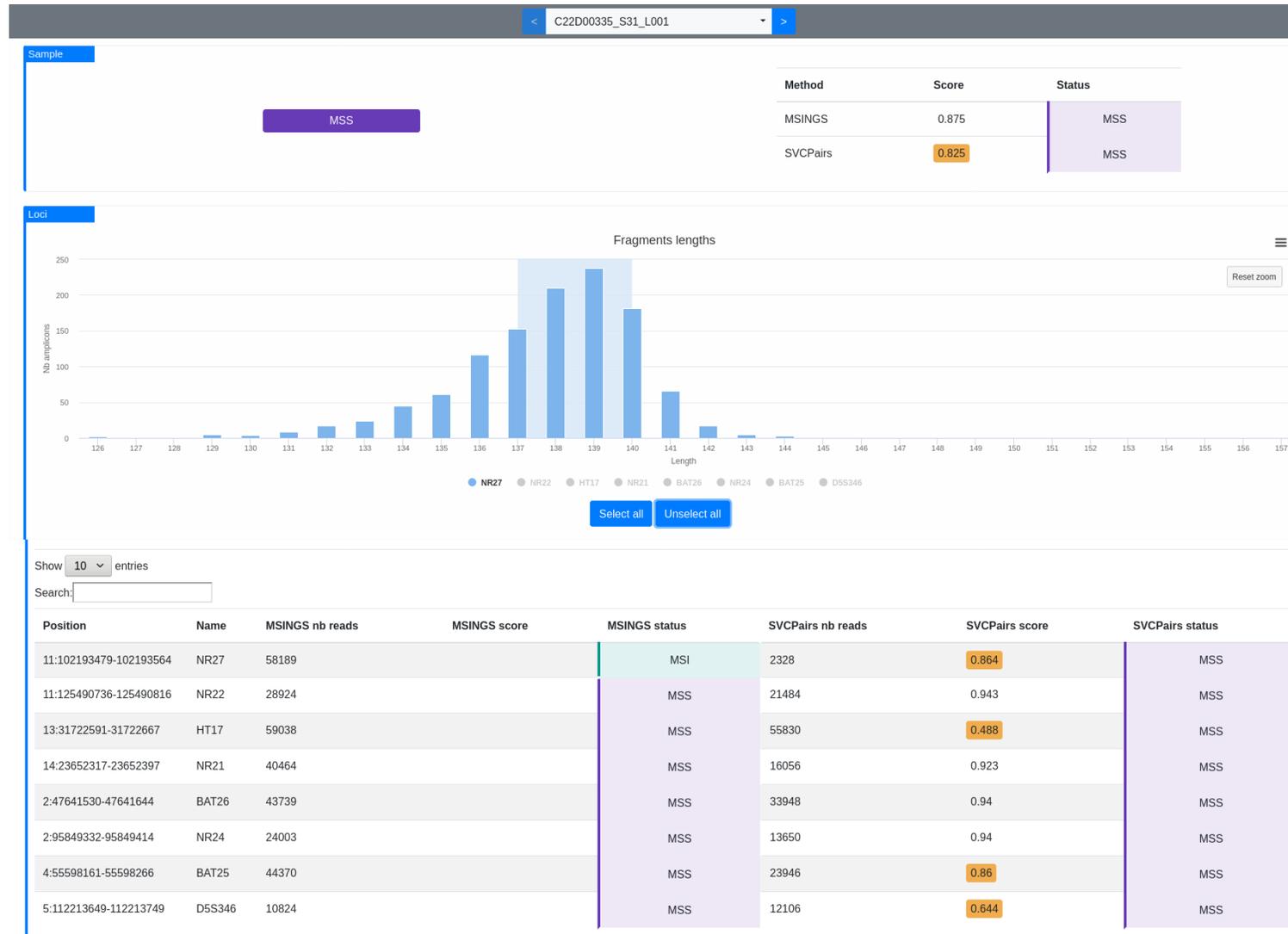
Select all  
Unselect all

Show 10 entries

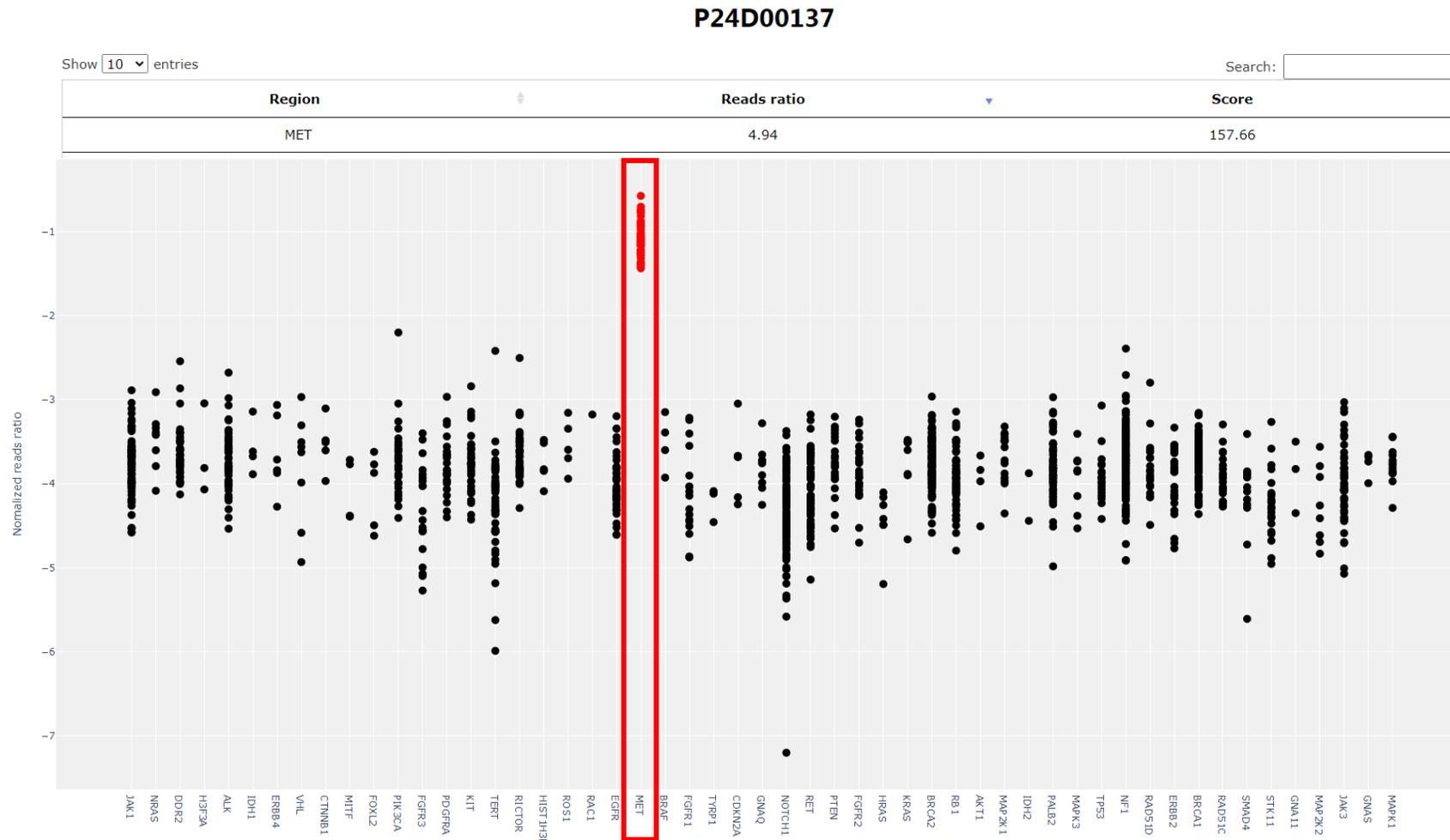
Search:

Position	Name	MSINGS nb reads	MSINGS score	MSINGS status	SVCPairs nb reads	SVCPairs score	SVCPairs status
11:102193479-102193564	NR27	58189		MSI	2328	0.864	MSS
11:125490736-125490816	NR22	28924		MSS	21484	0.943	MSS
13:31722591-31722667	HT17	59038		MSS	55830	0.488	MSS
14:23652317-23652397	NR21	40464		MSS	16056	0.923	MSS
2:47641530-47641644	BAT26	43739		MSS	33948	0.94	MSS
2:95849332-95849414	NR24	24003		MSS	13650	0.94	MSS
4:55598161-55598266	BAT25	44370		MSS	23946	0.86	MSS
5:112213649-112213749	D5S346	10824		MSS	12106	0.644	MSS

# Détermination du status MSI (MIAmS)

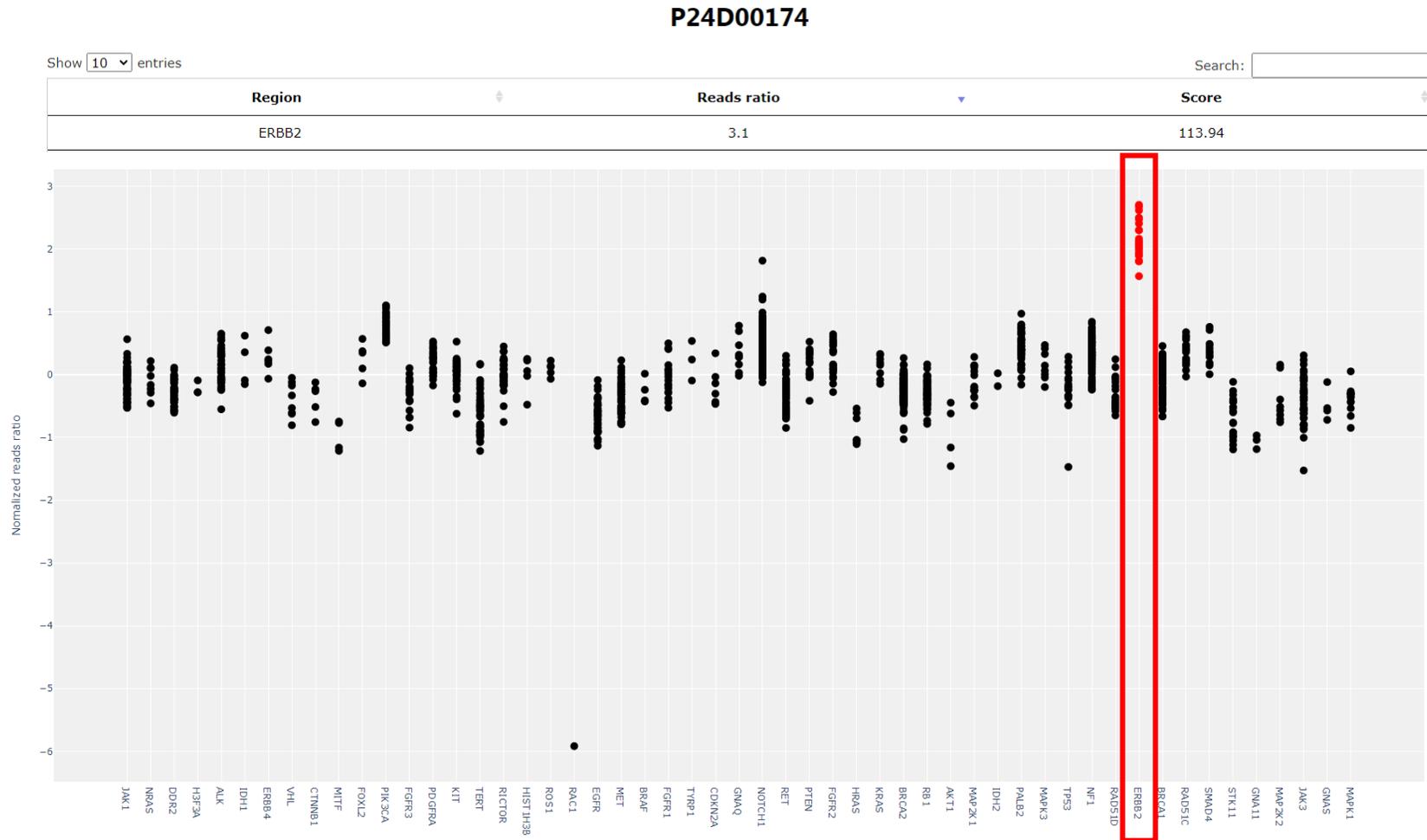


# Détection de CNV (*ifCNV*) : exemple d'amplification de *MET*



Ratio : 5  
10 copies de *MET*

# Détection de CNV (*ifCNV*) : exemple d'amplification de *ERBB2/Her2*



# Conclusions

- Pipelines constitués de logiciels personnalisés en libre accès
- Métriques pour une interprétation facile par l'utilisateur
- Interface graphique conviviale
- Adapté pour traiter des échantillons difficiles





# Remerciements

- ❖ L'équipe BioTS
- ❖ PMMG
- ❖ CHU Rennes : Alex, Marie, Amira, Florent
- ❖ IUCT Toulouse : David, Frédéric
- ❖ Curie : Céline, Victor