

BioinfoDiag

Retour d'expérience



Alexandra LESPAGNOL, – Docteur es science (PhD)
Responsable Logistique & Technique - Chef de projet Innovation
UF3154 – Laboratoire de Génétique Somatique (labellisé INCa)
LBMR - Génétique des tumeurs solides
Service de Génétique Moléculaire et Génomique Médicale
Alexandra.Lespagnol@chu-rennes.fr



CENTRE
HOSPITALIER
UNIVERSITAIRE
DE RENNES

Liens d'intérêt... d'Alexandra Lespagnol

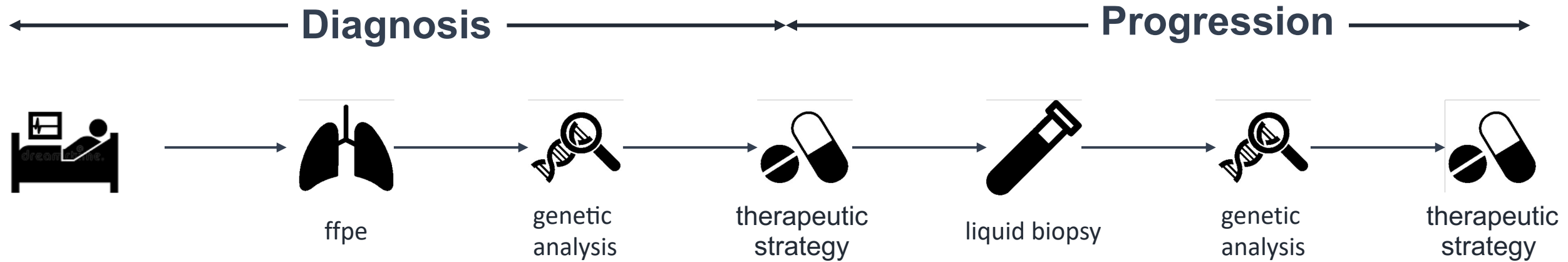
Amgen, AstraZeneca, Bayer, BMS, Deciphera, GSK, Menarini - Stemline, Tesaro, Incyte, Janssen, Lilly, Merck, MSD, Novartis, Pfizer, Pierre Fabre, Roche (FMI), Servier, Takeda

Soutien à la recherche et à l'innovation:

- Astrazeneca, BMS, Roche, MSD
- Fluidigm, IDSolution, Stilla, Promega



Missions des laboratoires de Génétique Somatique



More than 15 different cancers:
lung, prostate, breast, ovary, thyroid,
cholangiocarcinoma...

FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-
Embedded)
Liquid Biopsies (Blood)

Genetic analysis: NGS, dPCR, Pyrosequencing...

Over 25 different biomarkers/genes

Oncogenes: *ALK, EGFR, BRAF, KRAS, KIT, ESR1, PDGFRA, ...*

Tumor suppressor genes: *BRCA1, BRCA2, TP53, POLE ...*

Biomarkers theranostics prognostics diagnosis

Alterations: *Expression SNV Indel Fusion CNV*

Activity: 80 to 100 analyses per week (3,000 samples per year)

Institut National du Cancer (INCa)

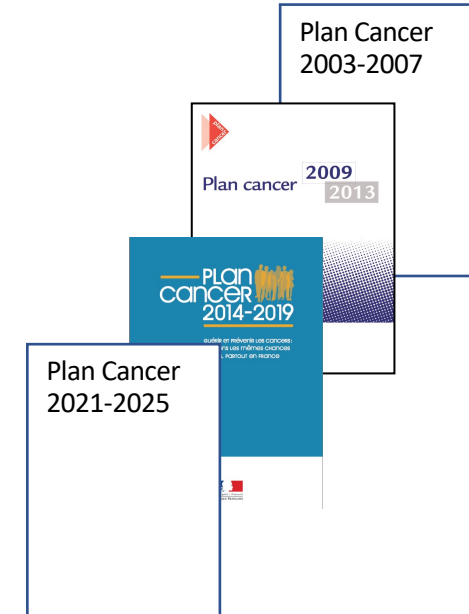
Agence sanitaire et scientifique de l'Etat créé en 2004

Assurer le suivi de la mise en œuvre des Plans cancer successifs

- ✓ En développant l'expertise dans le domaine du cancer
- ✓ En évaluant et en finançant des projets scientifiques

Missions

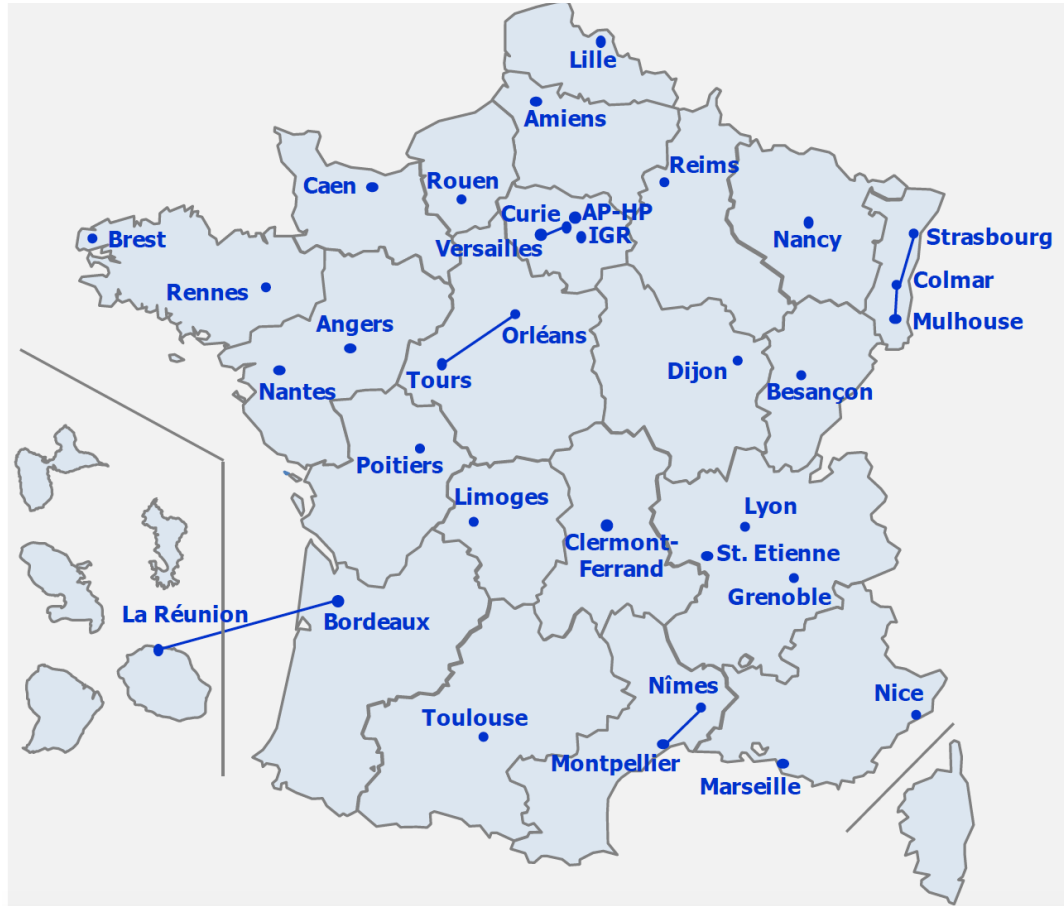
- ✓ Prévenir les cancers
- ✓ Diagnostiquer plus tôt les cancers
- ✓ Garantir l'accès à des soins de grande qualité pour tous
- ✓ Apporter une information adaptée aux populations, aux patients et aux professionnels
- ✓ Rechercher des moyens plus efficaces pour prévenir, diagnostiquer, traiter les cancers



<http://www.e-cancer.fr/>



Organisation française



Rechercher de Mutations acquises

- Participer & Orienter le processus diagnostic en complémentarité de paramètres cliniques, morphologiques et biologiques
- Permettre le suivi de la maladie résiduelle
- Orienter la stratégie de traitement
- Déterminer l'accès à une thérapie ciblée

En 2020, 85 000 patients ont bénéficiés d'un test pour l'accès à une thérapie ciblée
186 000 biomarqueurs déterminant l'accès à une thérapie ciblée ont été testés
63000 patients ont eu un test NGS

Mesure 21: Garantir un accès égal aux traitements et aux innovations.





Etat des lieux 2024

Remboursements partiels (40%) des tests aux établissements prescripteurs
Développement de l'activité dans les laboratoires d'ACP privés

Monopoles de certains laboratoires privés pour marqueurs complexes
Myriad (HRD, Endopredict) Foundation Medecine (TMB) ...

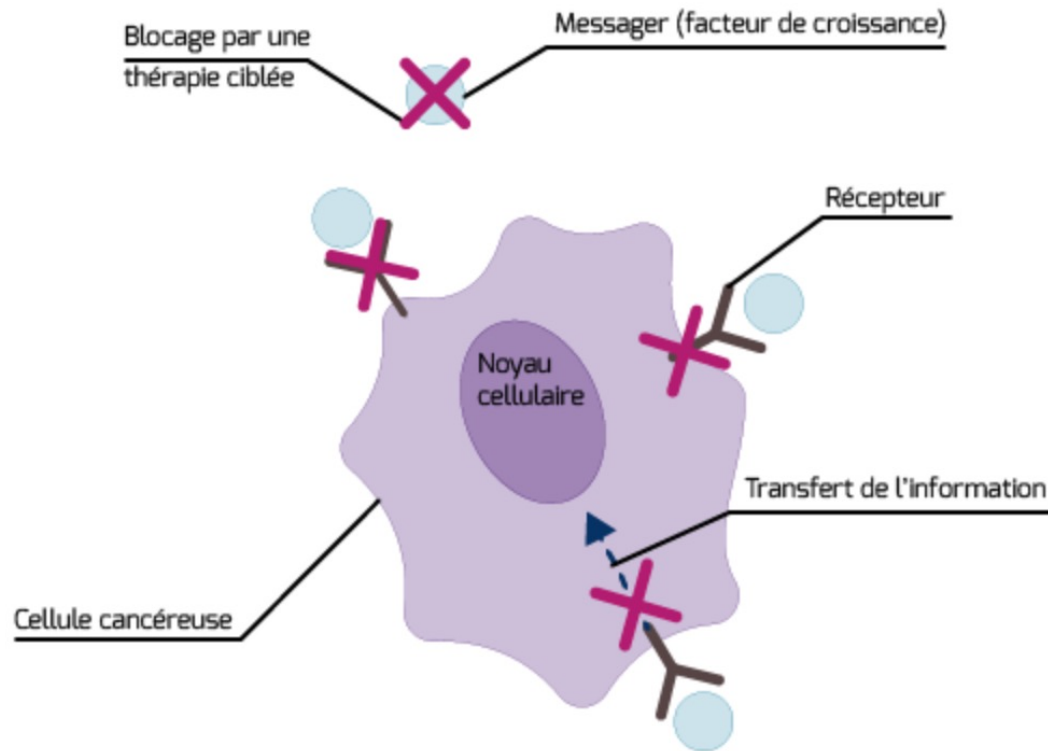
PFMG Seqioa Auragen

En 2020, 85 000 patients ont bénéficiés d'un test pour l'accès à une thérapie ciblée
186 000 biomarqueurs déterminant l'accès à une thérapie ciblée ont été testés
63000 patients ont eu un test NGS

Mesure 21 : Garantir un accès égal aux traitements et aux innovations.



Fonctionnement des thérapies ciblées?



Les différents niveaux de blocage des thérapies ciblées

Les thérapies ciblées ont pour objectif de bloquer la croissance ou la propagation de la tumeur

Les thérapies ciblées peuvent agir à différents niveaux de la tumeur ou des cellules :

- sur les facteurs de croissance
- sur leurs récepteurs
- sur des éléments à l'intérieur des cellules.

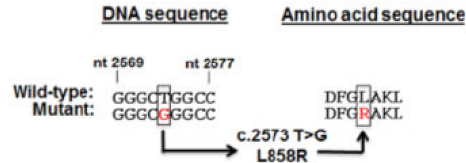
Les thérapies ciblées agissent en interférant avec des **anomalies moléculaires** ou avec des mécanismes qui sont à l'origine du développement ou de la dissémination des cellules cancéreuses.

« Médecine de précision »

Quelles anomalies moléculaires?

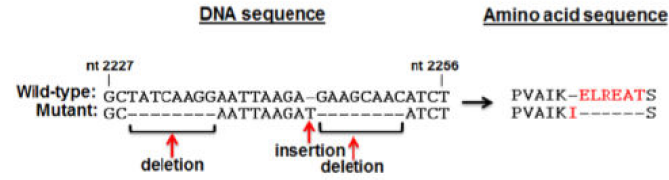
A.

Single-nucleotide variant: e.g., EGFR L858R (exon 21)



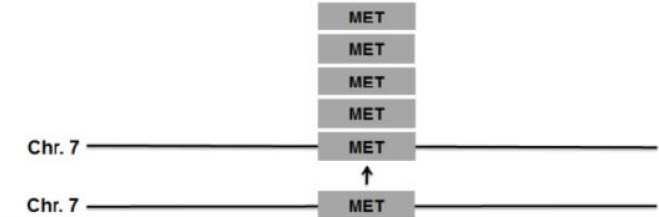
B.

Combined insertion/deletion: e.g., EGFR exon19 indel



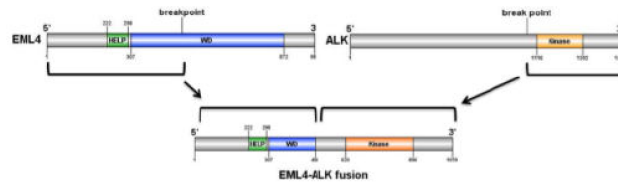
C.

Copy number variant: e.g., MET amplification



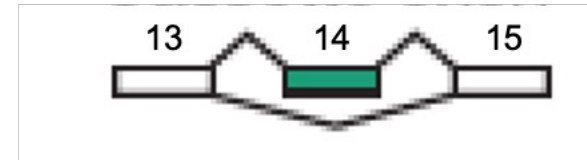
D.

Structural variant: e.g., EML4-ALK fusion



E.

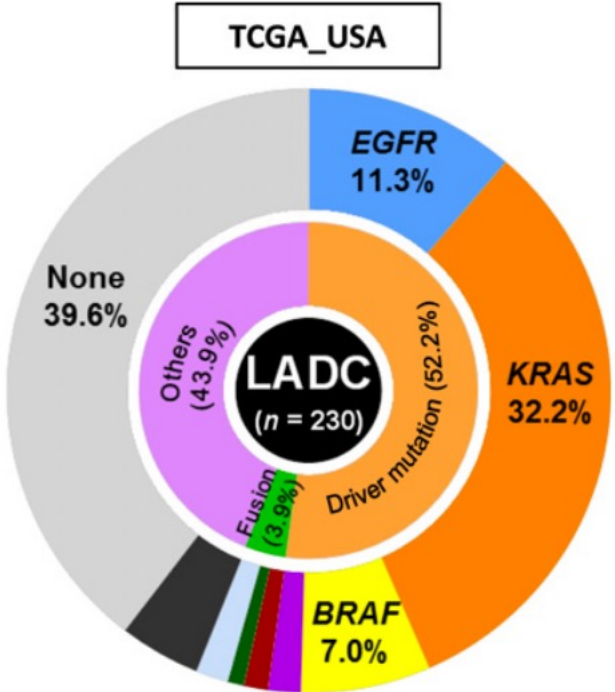
Aberrant RNA transcript: e.g., MET exon 14 skipping



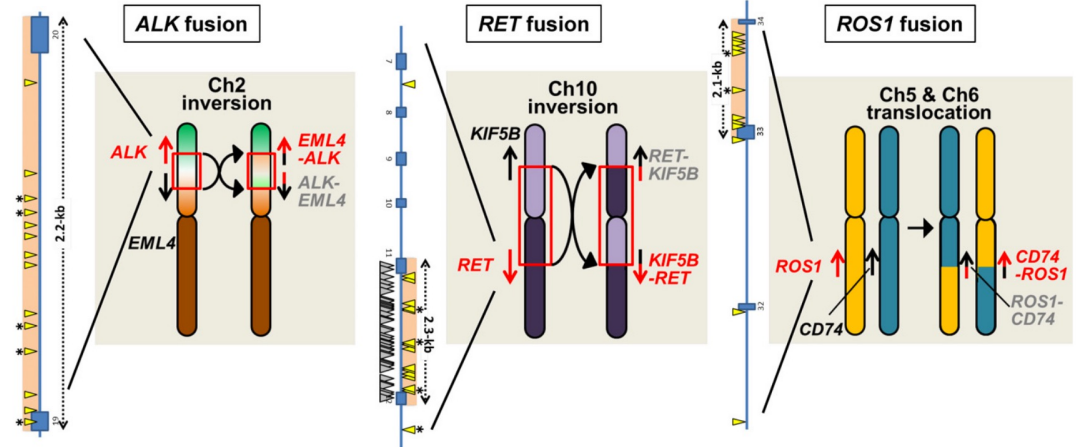
Autres types d'altérations

- Signature multigénique : profil d'expression de plusieurs gènes
- Charge mutationnelle (**TMB**) : nombre de mutations dans la tumeur (nbr / Mb)
- Instabilité microsatellitaire (**MSI**) :
- Instabilité génomique (GI) : analyse cicatrice du génome (score **HRD**)

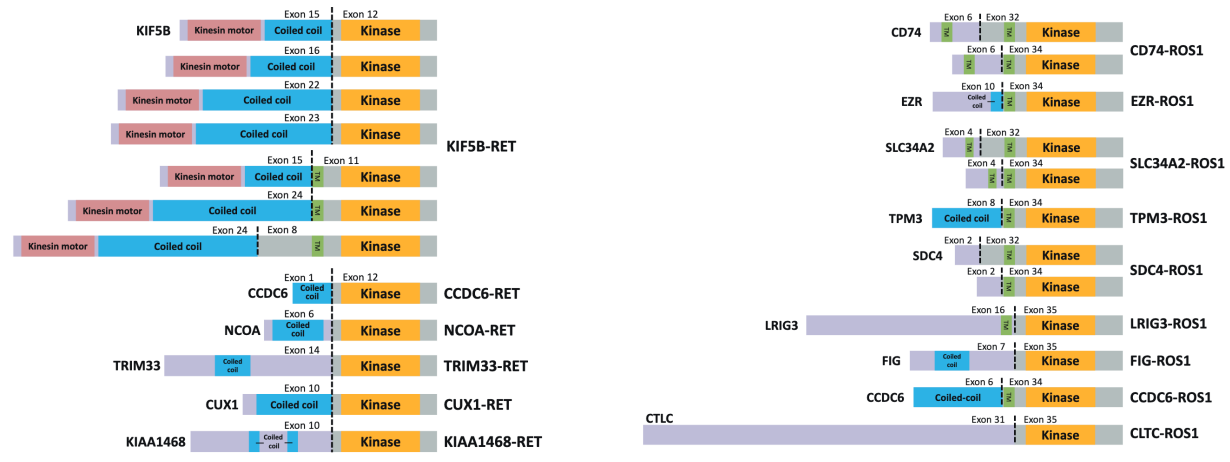
Cancer du poumon: addictions oncogéniques



- HER2 1.7%
- ALK fusion 1.3%
- RET fusion 0.9%
- ROS1 fusion 1.7%
- MET ex14 4.3%

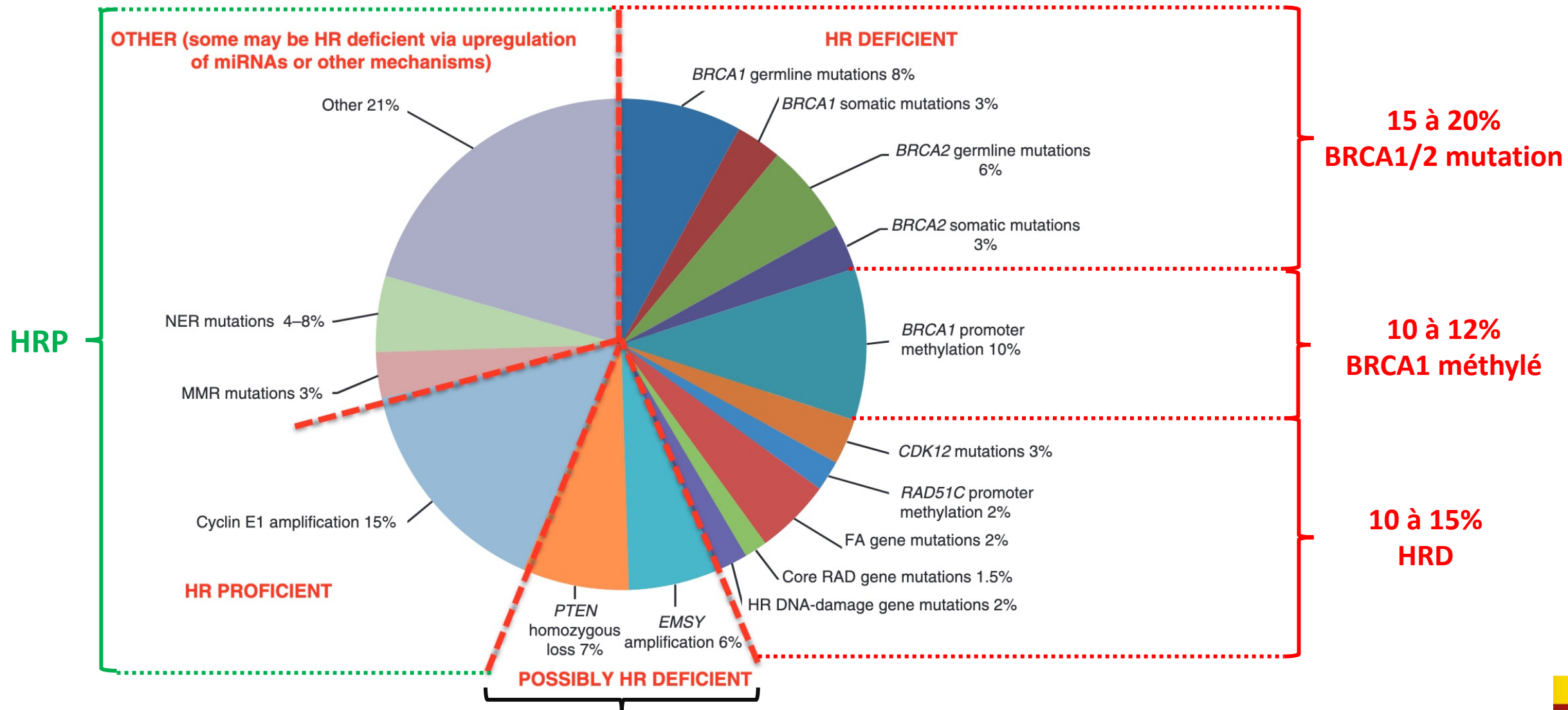


Gene aberrations for precision medicine against lung adenocarcinoma. Saito M, Shiraishi K, Kunitoh H, Takenoshita S, Yokota J, Kohno T. *Cancer Sci.* 2016 Jun



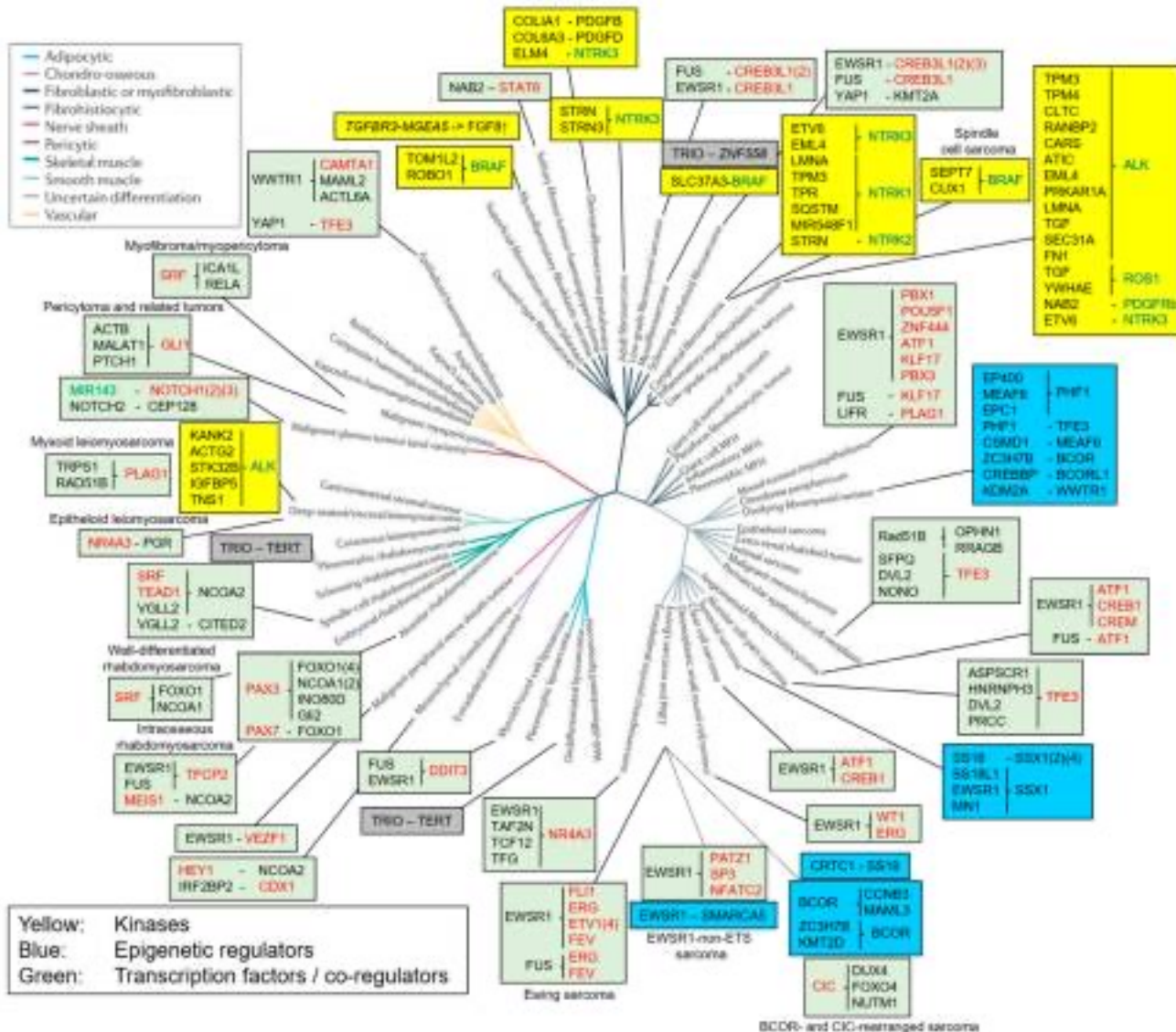
=> A visée théranostique déterminant l'accès à une thérapie ciblée

Profilage moléculaire des K ovaire



?? => A visée théranostique déterminant l'accès à une thérapie ciblée

Classification moléculaire des Sarcomes



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

1^{er} intention: RNA ciblé
 2^{eme} intention: RNAseq si RNA ciblé négatif

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

Cancer du sein: Signatures Génomiques

- Basés sur des dosages d'ARNm intra-tumoral
(expression gènes impliqués dans la prolifération de la tumeur et reflet de son profil d'agressivité biologique)
- Résultat : score génomique a vocation à classer les patientes en risque génomique favorable ou défavorable

Mammaprint	Signature de 70 gènes	Test centralisée aux Pays-Bas	Bas risque génomique ou haut risque génomique
Oncotype DX	Signature de 21 gènes	Test centralisée en Californie	Recurrence Score (RS) de 0 à 100 Rsque de récurrence si RS élevé
Endopredict	Signature de 12 gènes	Décentralisée sur une plateforme dédiée	Algorithme combinant le score génomique à des données cliniques Score à visée pronostique : EPclin. La réponse est binaire : bas-risque et haut risque.
Prosigna	Signature de 50 gènes	Décentralisée sur une plateforme dédiée	Algorithme combinant des données biologiques et cliniques Score à visée pronostique : ROR Classement en 3 catégories : bas risque, haut risque, risque intermédiaire L'analyse des 50 gènes permet de fournir avec précision le sous-type moléculaire de la tumeur

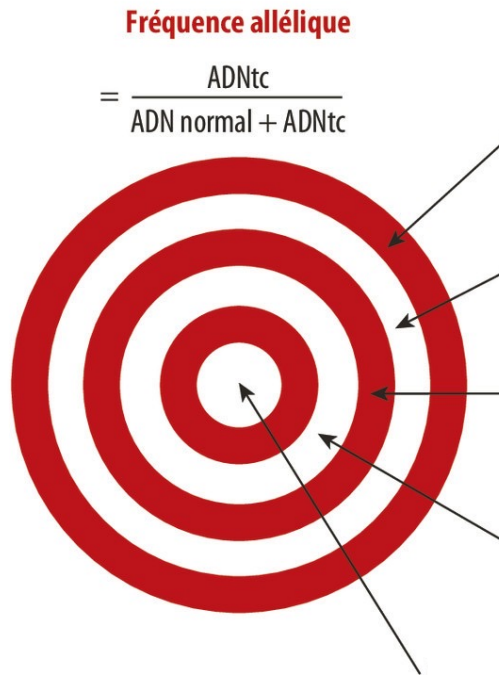
En **2017**, les 4 signatures ont été inscrites au Référentiel des actes Innovants Hors Nomenclature (RIHN)

En **2019**, la Haute Autorité de Santé évaluation de l'utilité clinique de quatre signatures génomiques dans le cancer du sein de stade précoce

En **2021 et 2022**, modifications de plusieurs recommandations internationales rapportant un risque de perte de chance sur le plan oncologique

En **2023**, redéfinition du périmètre de la population cible éligible en 2023 à une prise en charge des signatures génomiques dans le cadre du RIHN

Choix d'une technique adaptée au prélèvement



ADNtc: ADN tumoral circulant.

Technique	Sensitivity	Optimal Application
Sanger sequencing	> 10%	Tumor tissue
Pyrosequencing	10%	Tumor tissue
Next-generation sequencing	2%	Tumor tissue
Quantative PCR	1%	Tumor tissue
ARMS	0.10%	Tumor tissue
BEAMing, PAP, Digital PCR, TAM-Seq	0.01% or lower	ctDNA, rare variants in tumor tissue

Guide de calcul:

Avec 1000 copies (3ng dsDNA) => sensibilité de 1%

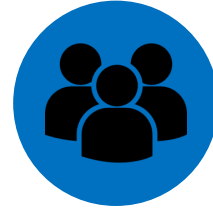
Extrapolation:

Pour une sensibilité de 0,01% = 100000 copies soit 300ng DNA

Cahier des charges & problématiques



- Nombre d'échantillons/activité
- Nombre d'échantillons/panel



- Production des librairies
- Développement des pipelines
- Analyse et interprétation



- Quantité d'analyte
- Taille des panels
- Type d'altérations



- TAT
- Délai de rendu



- ADN dégradé
- Analyte dilué
- Limite de détection (fa%)



- Financement des tests
- Investissement
- Cout de stockage

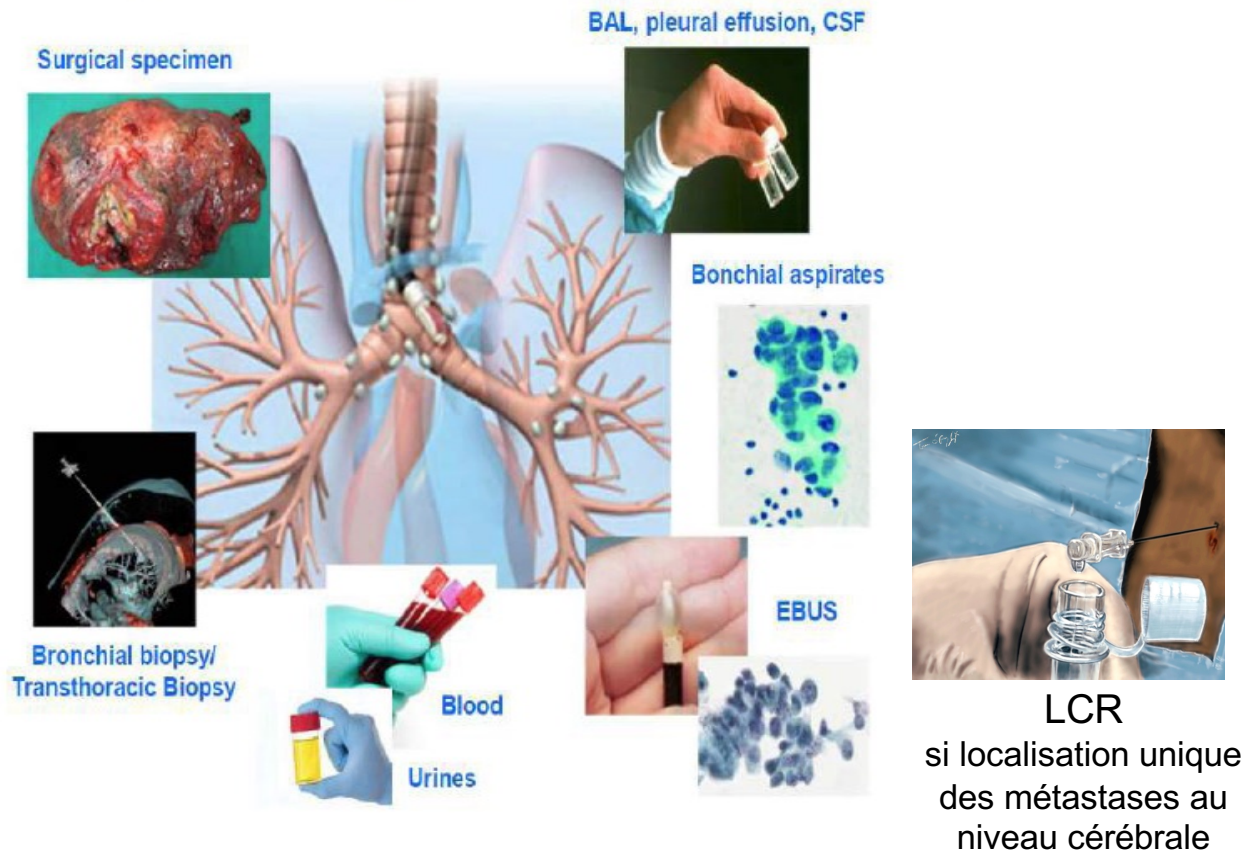
Prélèvements

Quels prélèvements

Biopsies solides



Extraction ADN & ARN



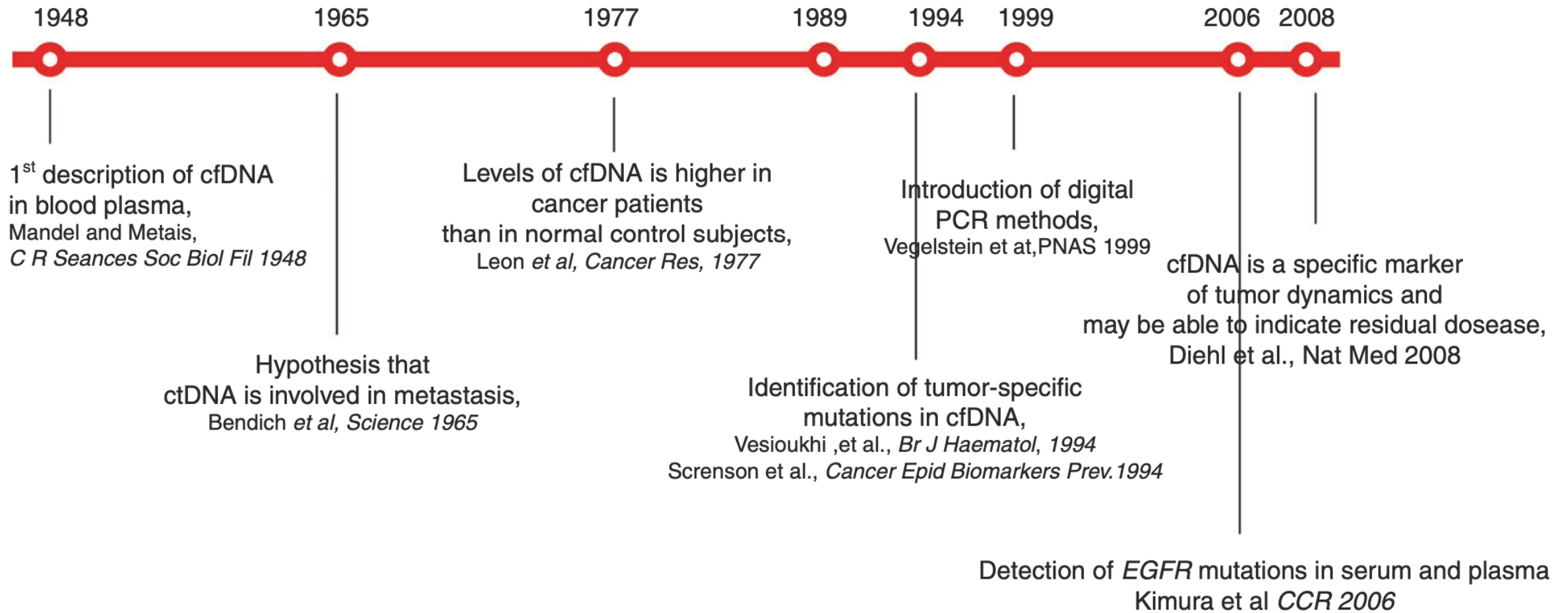
Biopsies liquides



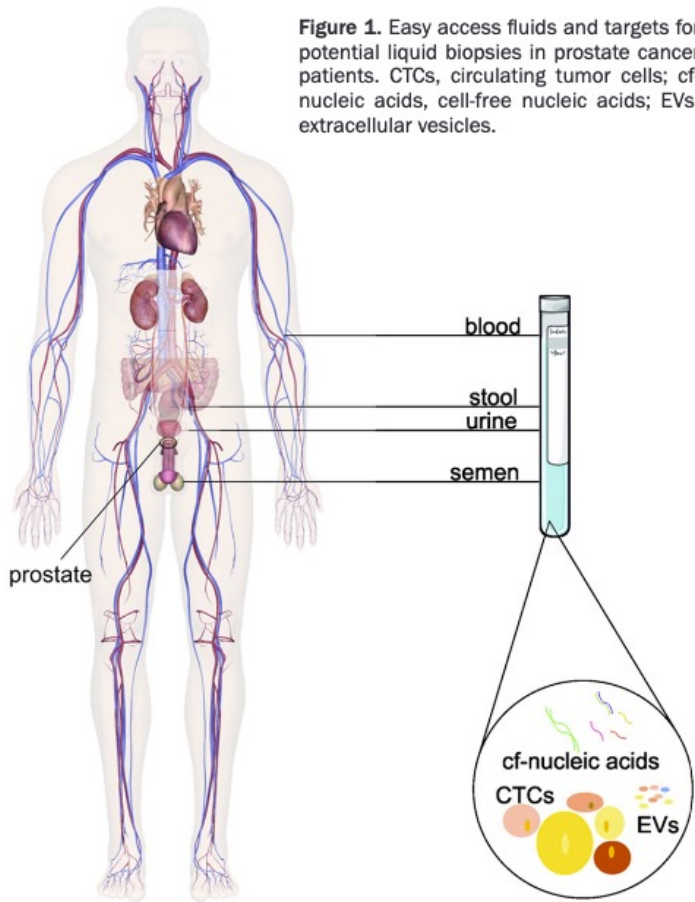
Extraction cfDNA



Chronologie du développement des biopsies liquides



Les biopsies liquides



CTC (circulating tumor cells)

Cellules circulantes provenant de tumeurs primaires et métastatiques

- Événement rare (0 à 100)
- Enrichissement par anticorps ou par la morphologie
- **Enumération**: corrélation entre le nombre de CTC et la réponse aux traitements chez les hommes atteints d'un cancer avancé de la prostate. Mais n'est pas utilisé comme facteur pronostic en routine clinique.
- **Analyse génétique**: CNV, gene expression, protein staining, DNA and RNA sequencing, fonctionnal assay and culture establishment

Evs (Extracellular vesicles)

composants cellulaires impliqués dans la communication intercellulaire

- Taille varie de 50 nm à 10 µm (exosomes, ectosomes et oncosomes)
- Produites par pratiquement toutes les cellules
- Population hétérogène (taille, contenu et mécanisme de libération) avec des fonctions biologiques variables
- Techniques d'isolement adaptées (ultracentrifugation, ultrafiltration ou immunoaffinité)
- Application potentielle prometteuse: biomarqueurs du PC
- **Analyse génétique**: CNV, gene expression, protein staining, DNA and RNA sequencing, fonctionnal assay

cfDNA (cell free DNA)

fragments d'ADN circulant librement dans le sang de cellules saines (cfDNA) et de cellules tumorales (ctDNA)

- Libéré par divers processus naturels et pathologiques: apoptose, nécrose ou libération par sécrétion
- Taux élevé chez les patients atteints de cancers (↗ avec le stade de la maladie)
- Mais l'exercice intense, les traumatismes, les infections et les inflammations peuvent faire augmenter les taux de cfDNA
- **Quantification**: facteur pronostic et de de réponse au traitement
- **Biomarqueurs**: CNV, fusion gene, mutation, methylation

Applications de la biopsie liquide

Au diagnostic

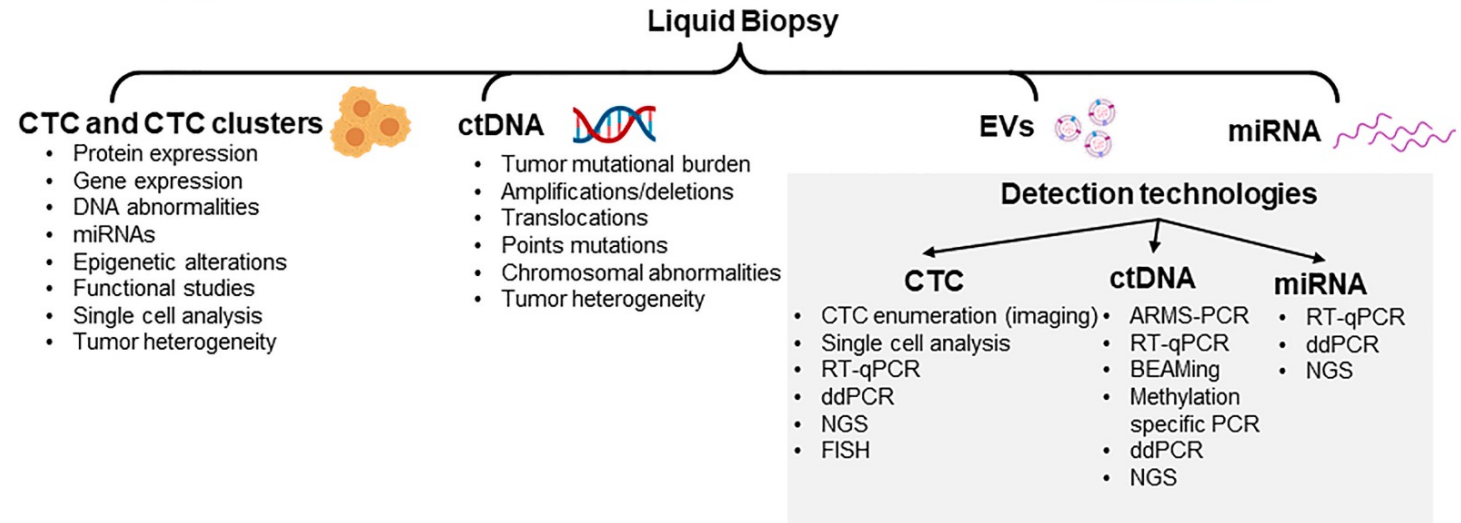
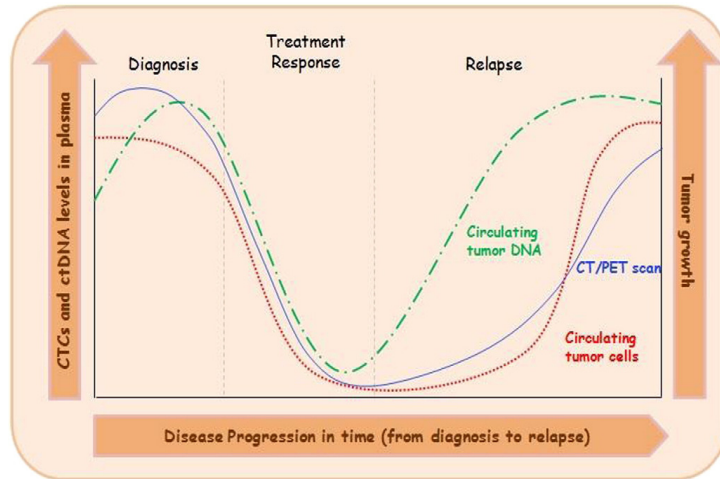
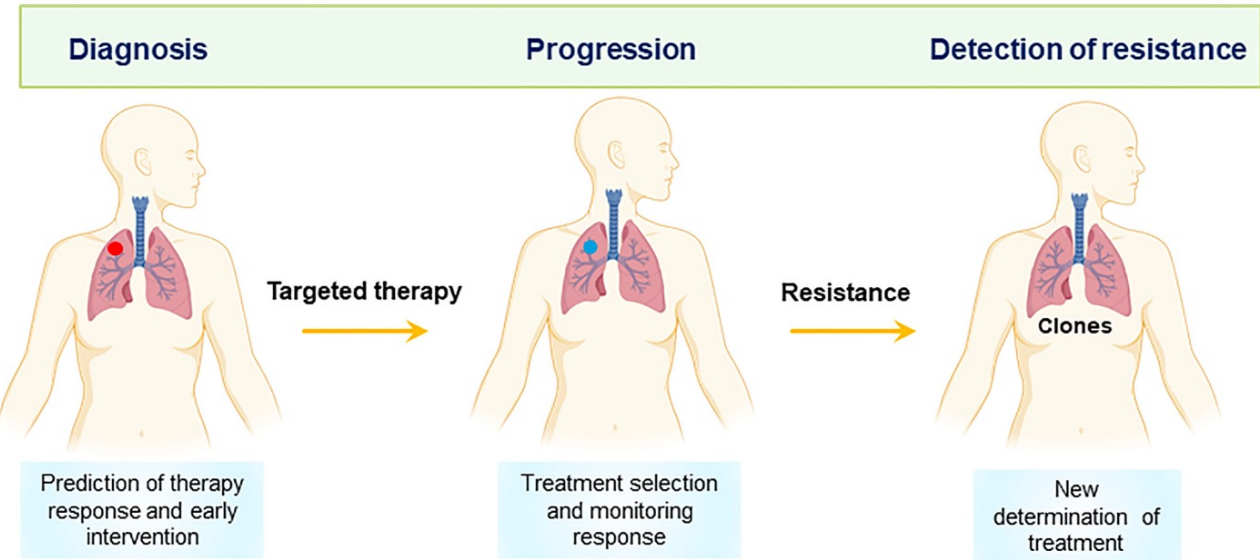
- ✓ Evaluation l'hétérogénéité moléculaire
- ✓ Stratifier la tumeur pour orienter la décision thérapeutique

Au cours de la maladie

- ✓ Surveiller la charge tumorale
- ✓ Détecter les chimiorésistances
- ✓ Suivre la maladie résiduelle

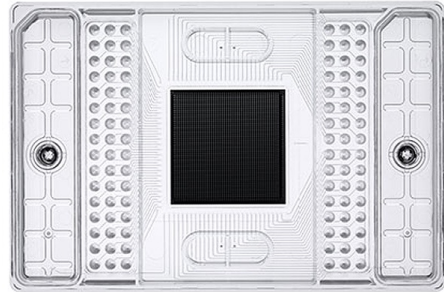
A la rechute

- ✓ Comprendre les mécanismes de résistances



CHU Rennes Panel ADN

Tout comme à Montpellier, ou Presque...



❖ Avantages de cette technique :

- Panel modulable
- Nécessite peu de quantité d'ADN (recommandé 20 ng, possible ≥ 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



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



Système Juno

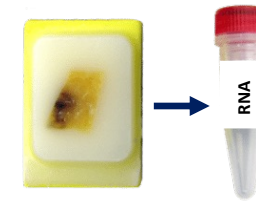
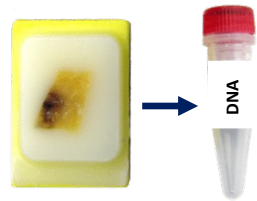
31 genes actionable hot spots	24 genes CNV targets	20 genes full-length coding DNA sequence
AKT1, BRAF, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, FGFR2, FGFR3, FOXL2, GNA11, GNAQ, GNAS, H3F3A, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3, MET, MITF, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAC1, ROS1, SMAD4, TYRP1	AKT1, 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

Extra-panel

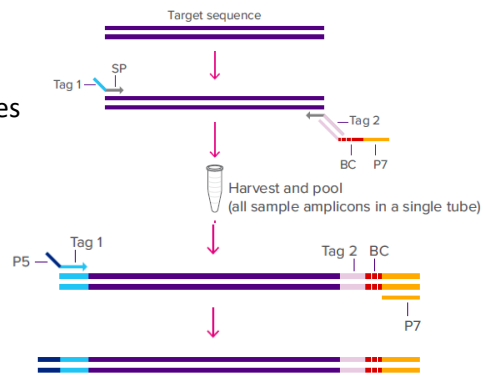
Librairie de routine

Validation de mutation sur ARN et effet sur épissage

Analyse ciblée du gène POLE

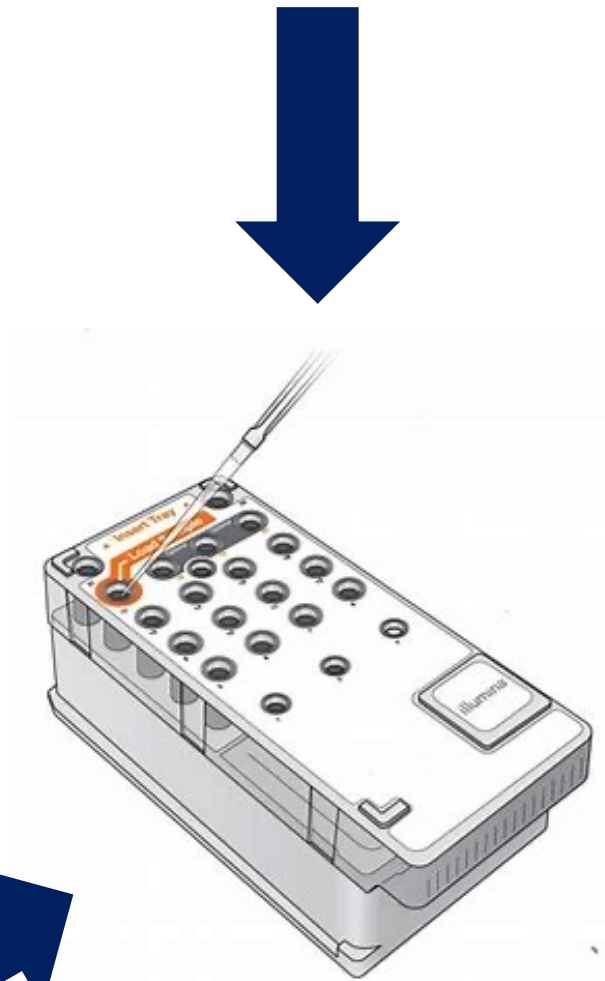


PCR
Amorces spécifiques du gène

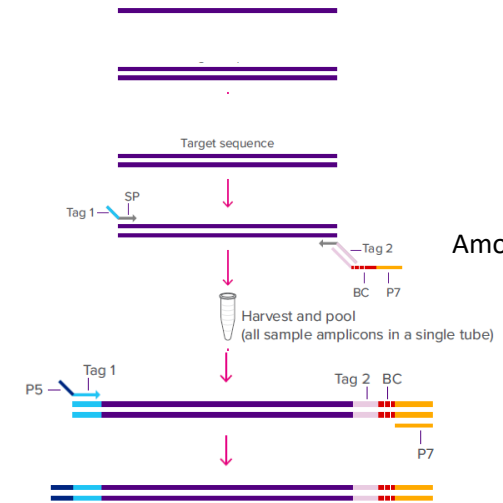


Indexage
Index Fluidigm

Purification & Quantification



Sur la même cartouche



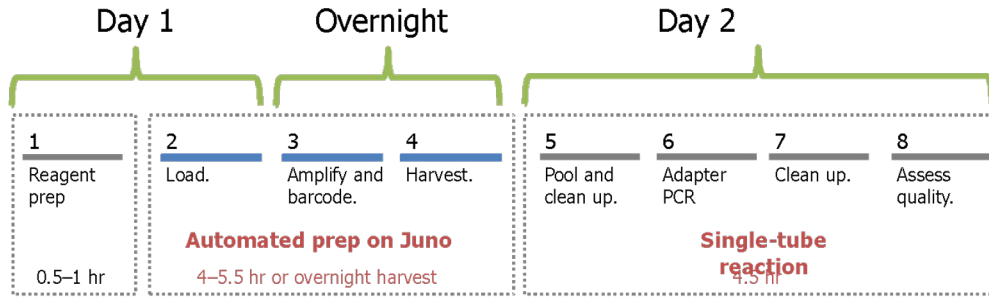
RT
PCR
Amorces spécifiques du gène

Indexage
Index Fluidigm

Purification & Quantification

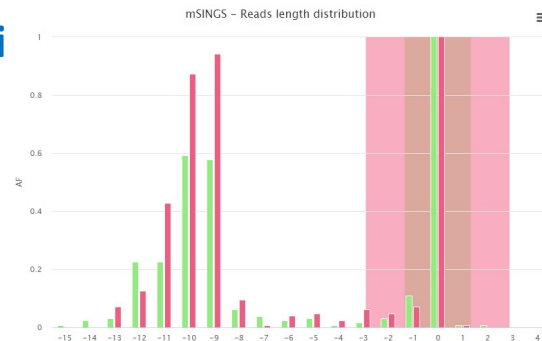
Panel n°2 (ovaire, sein, prostate, pancréas)

=> Protocole

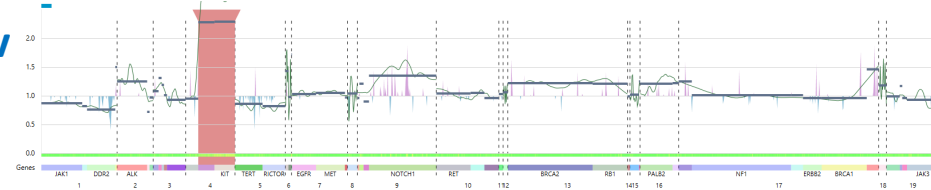


=> Amélioration des outils bioinformatique pour l'analyse et l'interprétation

• msi



• cnv



- grandes insertion/deletion
- duplication en tandem (IDT)

• Base de données:

IARC TP53 Database

COSMIC
Catalogue of somatic mutations in cancer

CANCER GENOME
INTERPRETER

UMD
Universal Mutation Database

Ve!P
Ensembl Variant Effect Predictor

Local Db

Florent Denoual

Amyra Aliouat

Full genes (18)	BRCA1, BRCA2, CDKN2A, DDR2, JAK1, JAK3, NF1, NOTCH1, PALB2, PTEN, RAD51C, RAD51D, RB1, RET, STK11, TERT, TP53, VHL
Hotspot genes (35)	AKT1, <u>ALK</u> , BRAF, CTNNB1, <u>EGFR</u> , <u>ERBB2</u> , ERBB4, <u>FGFR1/2/3</u> , FOXL1, GNA11, GNAQ, GNAS, H3F3A, HIST1H3B, HRAS, IDH1, IDH2, <u>KIT</u> , KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAPK1, MAPK3, <u>MET</u> , MITF, NRAS, <u>PDGFRA</u> , <u>PIK3CA</u> , RAC1, <u>RICTOR</u> , ROS1, SMAD4, TYRP1
<p>Panel de 53 gènes Taille des amplicons de 128 bp à 189 bp Couverture des zones introniques au minima -10 (5'), +10 (3') 29 CNV genes > 35 000 Cosmic IDs</p>	

Ovaire: 885 Prostate: 47
 Sein: 331 Autre: 83
 Pancréas: 42

Panel n°3 (pan-tumeur)

OncKB
Precision Oncology Knowledge Base

Cancer Hotspots

CANCER GENOME
INTERPRETER

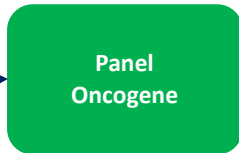
MY CANCER GENOME.
GENETICALLY INFORMED CANCER MEDICINE

INSTITUT
NATIONAL
DU CANCER

cBioPortal
FOR CANCER GENOMICS

THE UNIVERSITY OF TEXAS
MDAnderson
Cancer Center
Making Cancer History®

67 gènes



Panel ONCOdiag (34 gènes*)

AKT1, **ALK**, ARAF, BRAF, **CDKN2A**, **CDKN2B**, CTNNB1, **EGFR**, **ERBB2**, ESR1, **FGFR1**, **FGFR2**, **FGFR3**, GNA11, GNAQ, GNAS, H3-3A, H3-3B, H3C2, **HRAS**, IDH1, IDH2, **KIT**, **KRAS**, **MET**, **NRAS**, NTRK1, NTRK2, NTRK3, **PDGFRA**, **PIK3CA**, RAF1, RET, ROS1

+ statut MSI* (24 locci)

+ identito-vigilance / gender

* 19 gènes hotspot exon ou Tkdomain (mut only) & 15 gènes full exon (mut et **cnv***)

Panel PARPi (14 gènes*)

ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, CCNE1, CDK12, CHEK2, PALB2, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L, TP53

+ statut MSI* (24 locci)

+ identito-vigilance / gender

* 14 gènes full exon (mut et **cnv***)

Panel TSGdiag (19 gènes*)

B2M, BRIP1, CDH1, CHEK1, DICER1, FOXL2, KEAP1, MAP2K1, MAP2K2, MLH1, MRE11, MSH2, MSH6, PMS2, **POLD1**, **POLE**, PTEN, SMARCB1, STK11

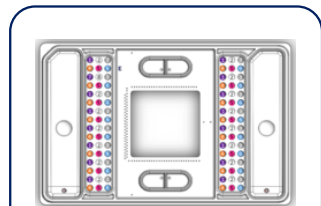
+ statut MSI* (24 locci)

+ identito-vigilance / gender

* 19 gènes full exon (mut et **cnv***)

1ere étape

Chargement de la puce



- ✓ IFC à usage unique (6 partitions)
- ✓ Volume réactionnel: 270 nL.
- ✓ Pas de preamplification

Puce IFC 8.8.6

30 à 60 min

2eme étape

Amplification

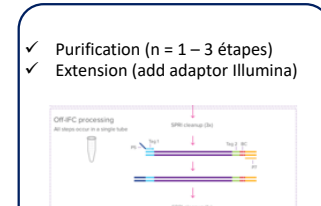


Juno

< 300 min

3eme étape

Purification & Quantification



- ✓ Purification (n = 1 – 3 étapes)
- ✓ Extension (add adaptor Illumina)

- ✓ Purification (n = 1 – 1 étape)
- ✓ Quantification BioAnalyseur

Paillasse

240 min par run

4eme étape

Séquençage



- ✓ Cartouche: 300 cycles MidOutput
- ✓ Programme: 2 x 151 cycles (index 10)
- ✓ 22 échantillons + 2 témoins (TPTB)

NextSeq

24 hrs

- ✓ Optimisation du run de séquençage
- ✓ Tous les panels toutes les semaines (RH constant)
- ✓ Nécessite moins de matériel
- ✓ Ajustement de la taille des amplicons
- ✓ Meilleure couverture des gènes
- ✓ Update par rapport aux besoins des prescripteurs

CHU Rennes Panel ARN

Tout comme à Montpellier ... ou Presque
Cf intervention de Julie

CHU Rennes Echappement thérapeutique

Technique multiplexe: : large panel ngs adn

Pôle régional
de Cancérologie
Bretagne

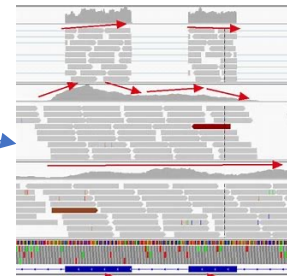


RCP moléculaire

OU



324 genes
SNV, indel, fusion, msi, tmb



RNAseq wes



Signature HRD

Approches pour la recherche d'instabilité génomique

Tout comme Montpellier ou Presque...

Approche	Approche	Disponibilité	Commercial/ Académique	Comparaison clinique	Utilisation
sWGS V2	sWGS Algorithme	France <i>via</i> Curie	Académique	Cohorte ENGOT-PAOLA-1	Favorable
GIScar	Panel de gènes Algorithme	France <i>via</i> centre Baclesse	Académique	Cohorte ENGOT-PAOLA1	Favorable [10]
SOPHiA DDM HRD Solution	sWGS Panel de gènes Algorithme	France	Commercial	Cohorte ENGOT-PAOLA1	Favorable [11]
Thermo Fisher OncoScan	SNP-array Algorithme	France	Commercial	Cohorte ENGOT-PAOLA1	Favorable [12]
Myriad MyChoice	Panel de gènes Algorithme	États-Unis Dijon	Commercial	Cohorte ENGOT-PAOLA1	Favorable
SeqOne	sWGS Panel de gènes Algorithme	France	Commercial	Cohorte ENGOT-PAOLA1	Favorable
Illumina TSO500 + HRD	Panel de gènes Algorithme	France	Commercial	Pas d'évaluation	En cours
AmoyDx HRD Focus	Panel de gènes Algorithme	France	Commercial	Pas d'évaluation	En cours

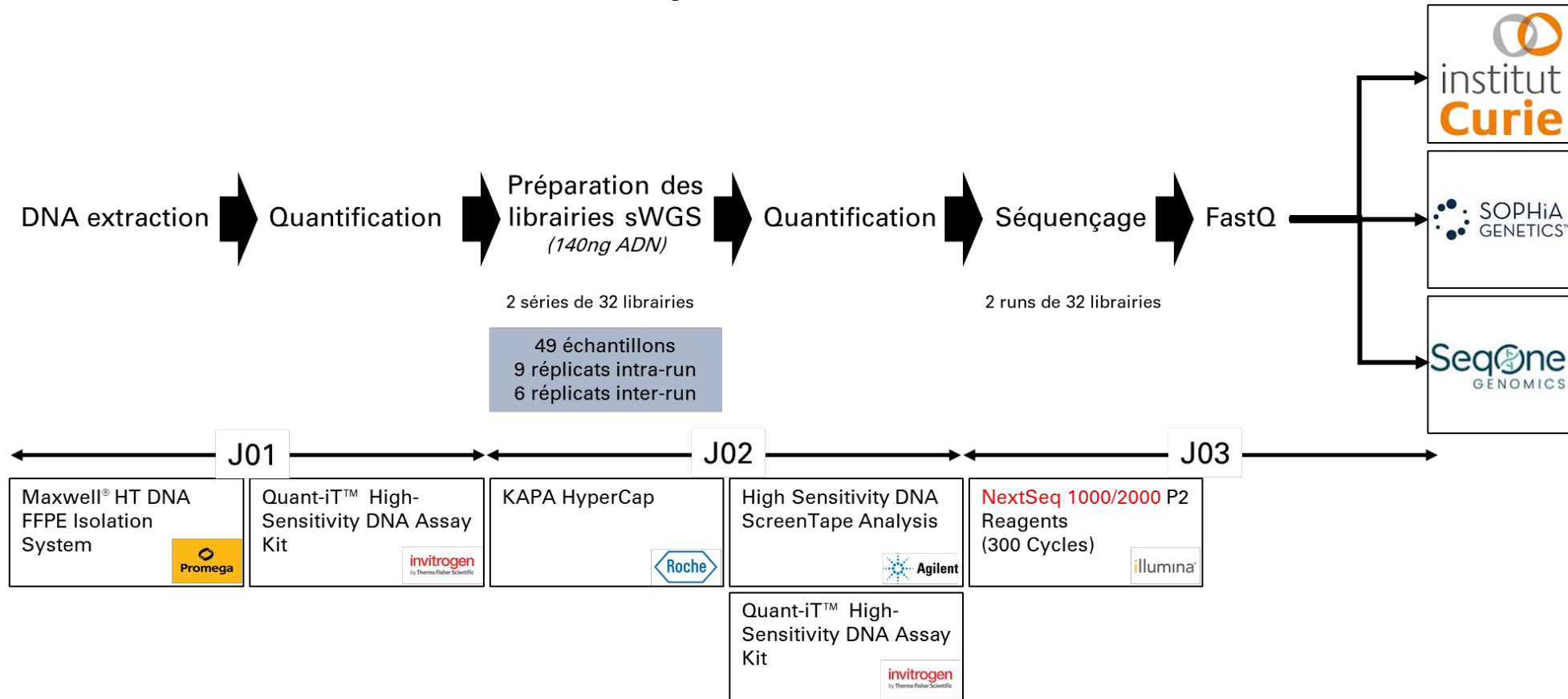


Pas comme Simon

Etude HRDcomp

Objectif:

Evaluation de 3 outils « DRY » sur les données produites « WET » dans les conditions du laboratoire



Descriptif des échantillons

Descriptif des échantillons		N
	Nombre d'échantillons	49
Score Myriad	HRDneg [0 - 34]	16
	Zone Grise [35 - 44]	12
	HRDpos [49 - 80]	16
	Non contributif	5
Type histologique	Carcinome séreux de haut grade	48
	Carcinome endometriode de haut grade	1
Localisation du prélèvement	Péritoine	22
	Ovaire	18
	Autre	9
Etat tumoral	Primitif	23
	Metastatique	19
	Indéterminé	7
Type de prélèvement	Biopsie	10
	Pièce opératoire	39
Pourcentage de cellules tumorales	25 à 50%	12
	> 50%	37
Mutation statut	BRCA1/2 non mute	49
	TP53 mute	49
	CCNE1 amplification	11
Origine des prélèvements	ACP_01 (n= 07) ACP_02 (n=01) ACP_03 (n=08) ACP_04 (n=05) ACP_05 (n=06) ACP_06 (n=03) ACP_07 (n=17) ACP_08 (n=02)	




Analyse est réalisée sur **49 échantillons** pour lesquels le statut HRD était connu et déterminé par le test MyChoice® CDx Plus (Myriad).

Répétabilité et la **reproductibilité** ont été évaluées sur 15 échantillons.



64 bibliothèques préparées en 2 séries et séquencées sur 2 runs

Metrics

	ShallowHRD v2 		GInger 		SomaHRD v1.2 	
Prérequis	/		% of tumoral cells > 20%		% of tumoral cells > 20%	
QC metrics	sWGS Coverage Tumor_content FFPE Noise_level Fraction coverage	< 0.5 Low; > 1 optimal No/Low/Average/High Low/Moderate/High /	Nb. WGS fragments Prop. coverage outliers Purity Ploidy ratio PPR Residual noise (RN) SNR (signal/RN)	< 4 M failed > 20 failed Detected optimal > 0.17 failed Low failed	sWGS Coverage % mapping Tumor fraction	< 0.1 failed; < 0.5 warning < 50% failed; < 70% warning (in progress)
	Warning Failed only if no tumor		QA status used for interprétation (Low/Medium/High)		Failed (Cov. or % Mapping)	
Autres informations	CCNE1 amplification HER2 amplification		/		CCNE1 cnv RAD51B cnv	
HRD interpretation	Score HRD status Ratio_HRD_non_HRD Stability warning Interval score HRD		GI index HRD status		Score (LGA, LPC) GI Confidence (< 0.85 failed; < 0.93 warning) HRD status	

Résultats

	ShallowHRD v2	GIInger	SomaHRD v1.2
	N = 44 samples		
samples failed (QC)	1	8	7
	43	36	37
samples inconclusive	-	2	22
samples warning	6	8	
	38	28	19
True Positive	11	14	7
True Negative	22	9	8
False Positive	0	3	1
False Negative	5	2	3
Positive Predictive Value (*)	100%	82.35%	87.50%
Negative Predictive Value (*)	81,48 %	81.82%	72.73%

Take-home message

- **Importance du prélèvement (qualité, fixation, tumor content ...)**
- **Choix des techniques en fonction de l'organisation des laboratoires (RH equipments...)**
- **Pour les solutions « DRY only » obligation de valider l'étape « WET »**
- **Sous-traitance de l'analyse bioinformatique au cœur des discussions**