

# APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS LA PRISE EN CHARGE DU CANCER DE L'OVAIRE

Plateforme de Génétique des Cancers solides du Limousin  
Karine Durand

# Sommaire

- Introduction : HRD, HRR, létalité synthétique
- Workflow des analyses HRD
- Interprétation des mutations : quel paramètres analyser?
- Et la suite: analyse du phénotype HRD
- Conclusion

# Sommaire

- Introduction : HRD, HRR, létalité synthétique
- Workflow des analyses HRD
- Interprétation des mutations : quel paramètres analyser?
- Et la suite: analyse du phénotype HRD
- Conclusion

# HRR, HRD, létalité synthétique

HRR : Réparation par Recombinaison Homologue

HRD : Homologous Recombination Deficiency

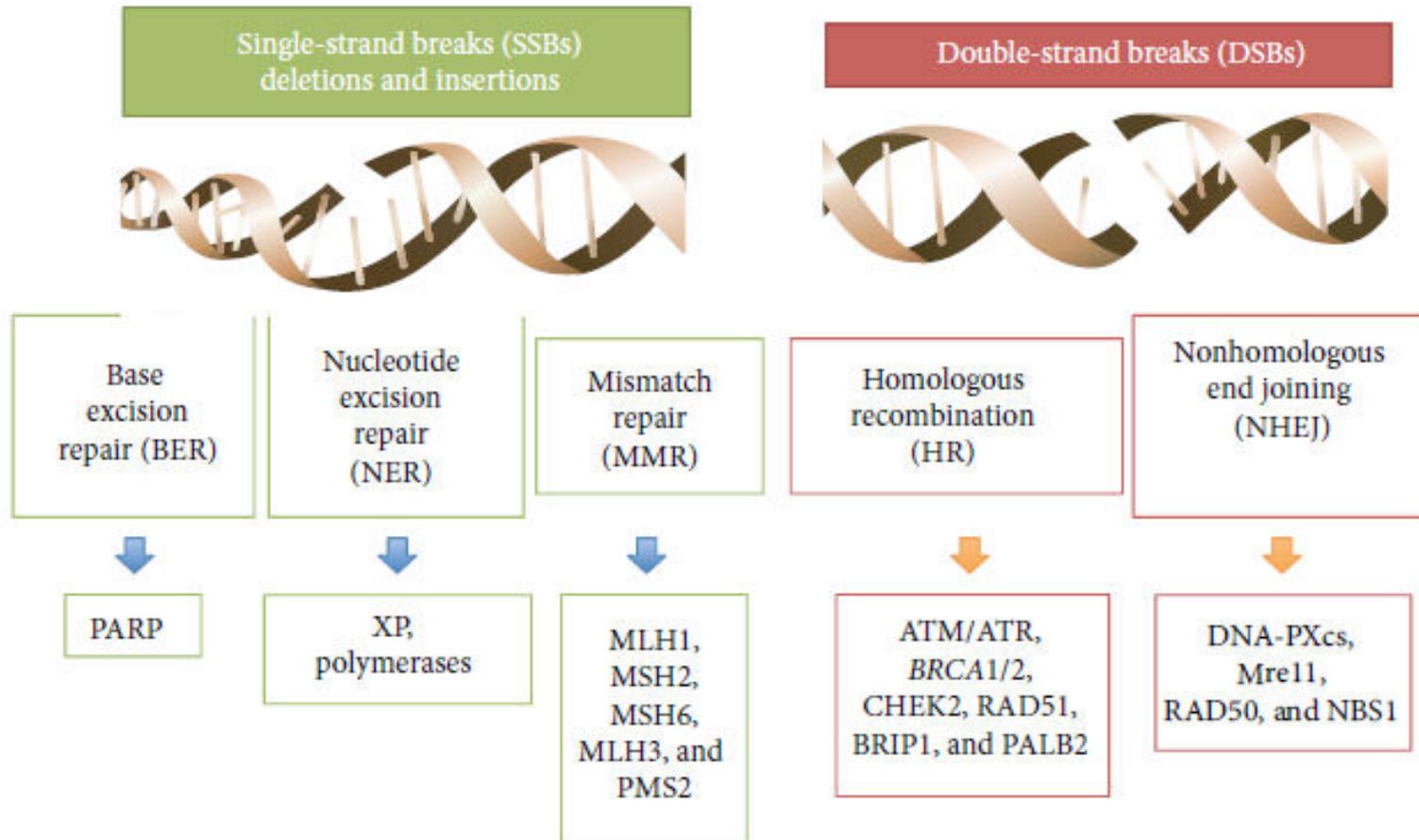
Létalité synthétique : mort cellulaire par combinaison de deux effets

# HRR, HRD, létalité synthétique

HRR : Réparation par Recombinaison Homologue

HRD : Homologous Recombination Deficiency

Létalité synthétique : mort cellulaire par combinaison de deux effets

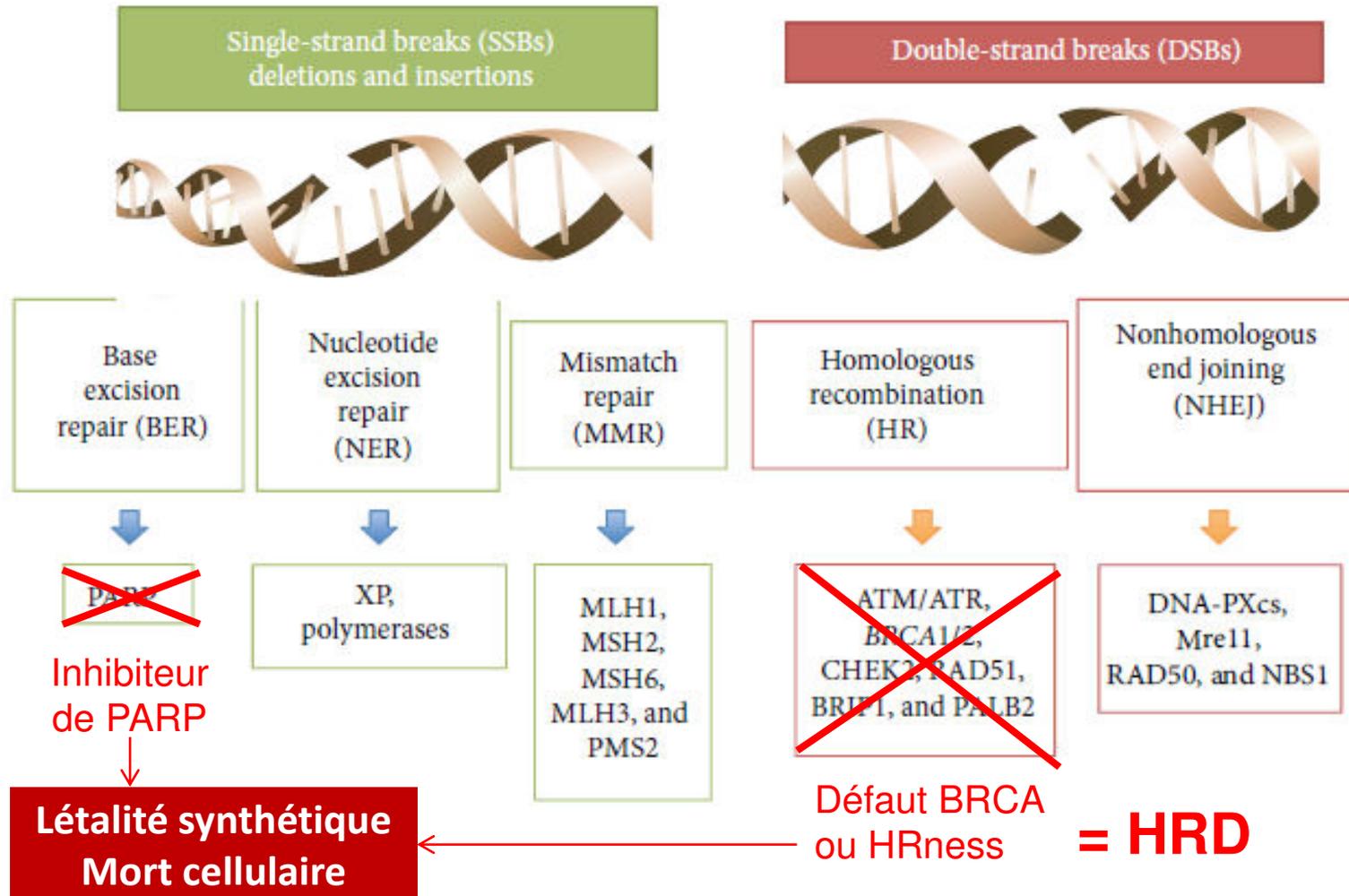


# HRR, HRD, létalité synthétique

HRR : Réparation par Recombinaison Homologue

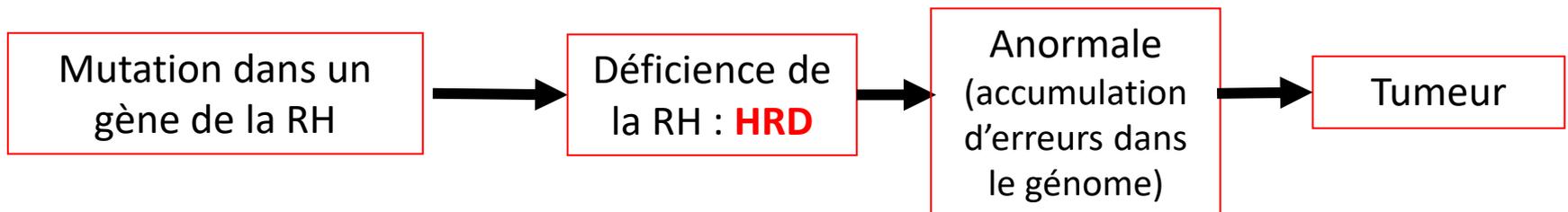
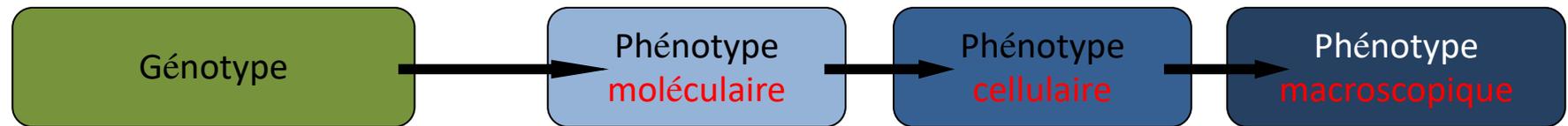
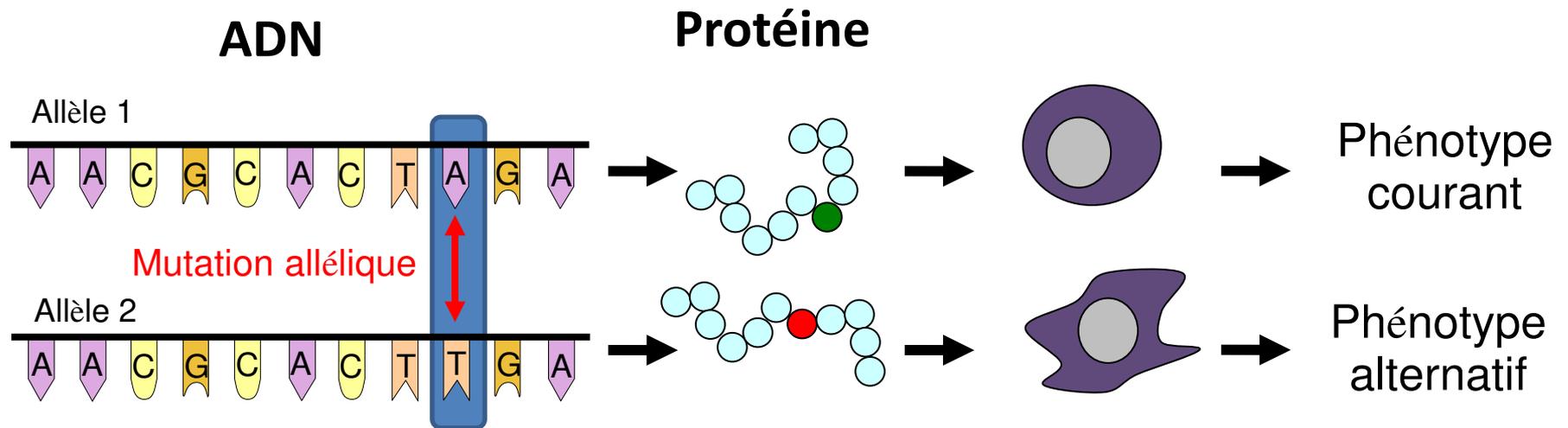
HRD : Homologous Recombination Deficiency

Létalité synthétique : mort cellulaire par combinaison de deux effets



# HRR, HRD, létalité synthétique

- Comme pour tout mécanisme oncogénique, le **phénotype HRD** peut être engendré par un **génotype** particulier



# Génotype : anomalies dans les gènes de RH

BRCA	Autres gènes de réparation		
BRCA1	ATM	FANCD2	RAD50
BRCA2	ATR	FANCE	RAD51
	ATRX	FANCF	RAD51B
	BARD1	FANCG	RAD51C
	BLM	FANCI	RAD51D
	BRIP1	FANCL	RAD52
	CDK12	FANCM	RAD54L
	CHEK1	MRE11A	RPA1
	CHEK2	NBN	TP53
	FANCA	PALB2	...
	FANCC	PPP2R2A	

Tous les gènes de réparation sont des ANTI-ONCOGENES  
Les 2 copies doivent être inactivées pour entrainer une perte  
de la protéine et donc un phénotype HRD

# Génotype : anomalies dans les gènes de RH

## Hypothèse de Knudson

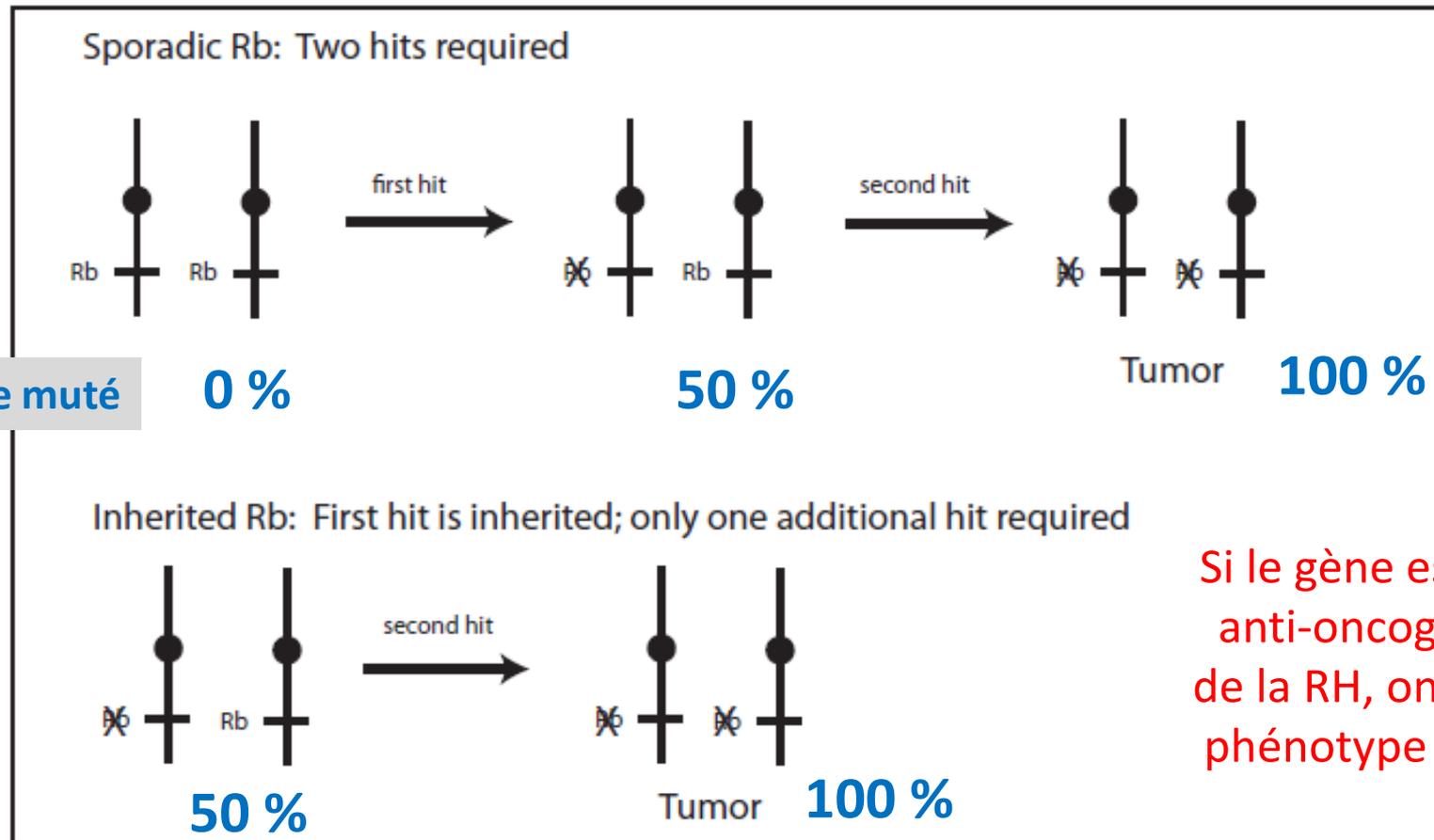


Figure 1. Knudson's two-hit hypothesis for retinoblastoma. In sporadic Rb, both copies of RB1 (RB1) must be inactivated. This requires two mutational events "hits" which each inactivate one copy of RB1. In inherited Rb, the first hit is inherited.

# Phénotype cellulaire : conséquences de l'HRD

## Cicatrices génomiques +++



**Loss of heterozygosity (LOH)**

Présence d'un seul allèle <sup>1</sup>



**Telomeric allelic imbalance (TAI)**

Perte du rapport allélique 1:1 à la fin du chromosome (télomère) <sup>2</sup>



**Large-scale state transitions (LST)**

Cassures chromosomiques à grande échelle <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Abkevich et al. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. Br J Cancer. 2012 Nov 6;107(10):1776-82

<sup>2</sup> Birkbak et al. Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents. Cancer Discov. 2012 Apr;2(4):366-375

<sup>3</sup> Popova et al. Ploidy and large-scale genomic instability consistently identify basal-like breast carcinomas with BRCA1/2 inactivation. Cancer Res. 2012 Nov 1;72(21):5454-62.

# Intérêt du testing

- Recherche des anomalies qui peuvent conduire à la perte des anti-oncogènes, et donc au phénotype HRD
- Et donc offrant une possibilité d'induire la létalité synthétique avec un PARPi

## Diagnostic d'HRD

### Deux stratégies complémentaires

- Recherche de mutations (germinales ou somatiques) : **Génotype**
- Analyse des signatures génomiques : **Phénotype**

# Sommaire

- Introduction : HRD, HRR, létalité synthétique
- **Workflow des analyses HRD**
- Interprétation des mutations : quel paramètres analyser?
- Et la suite: analyse du phénotype HRD
- Conclusion

# Stratégie et historique de notre région

2018



BRCA

BRCA1

BRCA2

Recherche des mutations somatiques

*Cancers de l'ovaire*

# Stratégie et historique de notre région

2018

2019



**BRCA**

BRCA1

BRCA2

Recherche des mutations somatiques

*Cancers de l'ovaire*

*Cancers du sein*

*Cancers du pancréas*

*Cancers de la prostate*

# Stratégie et historique de notre région

2018

2019

BRCA

BRCA1  
BRCA2

## Workflow des analyses

DIAGNOSTIC anatomo-  
pathologique

CHU ou extérieurs

Extraction d'ADN tumoral

Qualification de l'ADN par fluorimétrie et qPCR

Séquençage des exons  
complets de BRCA1 /2

### Séquençage-haut-débit

- kit Ampliseq BRCA Oncomine (ThermoFischer)
- Analyse par les logiciels torrent suite -Ion reporter
- Visualisation par IGV (Integrative Genomics Viewer, Broad Institute)

Interprétation / classification

# Stratégie et historique de notre région

2018

Aout 2020

## BRCA

BRCA1  
BRCA2

## Panel GREAT (Gene HRR Extensive ovArian cancer Testing)

BRCA1	ATM	FANCD2	RAD50
BRCA2	ATR	FANCE	RAD51
	ATRX	FANCF	RAD51B
	BARD1	FANCG	RAD51C
	BLM	FANCI	RAD51D
	BRIP1	FANCL	RAD52
	CDK12	FANCM	RAD54L
	CHEK1	MRE11A	RPA1
	CHEK2	NBN	TP53
	FANCA	PALB2	
	FANCC	PPP2R2A	

# Stratégie et historique de notre région

2018

Aout 2020

## BRCA

BRCA1  
BRCA2

## Panel GREAT (Gene HRR Extensive ovArian cancer Testing)

BRCA1  
BRCA2  
ATM, BARD1, BRIP1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCA, FANCD2, FANCL, MRE11A, NBN, PALB2, PP2R2A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L, TP53

## Workflow des analyses

DIAGNOSTIC anatomo-  
pathologique

CHU ou extérieurs

Extraction d'ADN tumoral

Qualification de l'ADN par fluorimétrie et qPCR

Séquençage des exons  
complets des 20 gènes

### Séquençage-haut-débit

- kit Sophia Genetics **CAPTURE** / Séquenceur MiSeq
- Analyse par Sophia DDM
- Visualisation par IGV (Integrative Genomics Viewer, Broad Institute)

Interprétation / classification

# Sommaire

- Introduction : HRD, HRR, létalité synthétique
- Workflow des analyses HRD
- **Interprétation des mutations : quel paramètres analyser?**
- Et la suite: analyse du phénotype HRD
- Conclusion

# Interprétation des mutations (=variants)

## Exemple de compte-rendu de génotype

### RESULTATS

#### Variant pathogènes (classe 5) :

Gène	Référence	Variant	Altération protéique	Fréq. allélique	Profondeur
<i>BRCA2</i>	NM_000059	c.2809C>T	p.(Gln937*)	75.2 %	1025 X
<i>TP53</i>	NM_000546	c.129_136del	p.(Leu43Phefs*6)	70.9 %	5334 X

#### Variant de signification inconnue (UV) :

Gène	Référence	Variant	Altération protéique	Fréq. allélique	Profondeur
<i>BRCA2</i>	NM_000059	11 c.6265G>A	p.(Glu2089Lys)	32.6 %	2525 X
<i>CDK12</i>	NM_016507	13 c.3533C>G	p.(Ser1178Cys)	28.5 %	8347 X

#### Gènes pour lesquels aucune anomalie cliniquement significative n'a été détectée :

*ATM, BARD1, BRCA1, BRIP1, CHEK1, CHEK2, FANCA, FANCD2, FANCL, MRE11, NBN, PPP2R2A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L.*

# Interprétation des mutations (=variants)

## Interprétation en trois temps

### **(1) Vérification de la qualité de l'analyse**

*Paramètres techniques (Couverture, profondeur, spécificité de l'hybridation des sondes...)*

### **(2) Vérification de la pertinence du variant mis en évidence**

*Ne pas laisser passer de faux positifs*

### **(3) Revue des bases de données et de la littérature pour le classer**

*Orienter sur la suite du parcours de soin (oncogénétique, suite thérapeutique ...)*

# Interprétation des mutations (=variants)

## Interprétation en trois temps

### **(1) Vérification de la qualité de l'analyse**

*Paramètres techniques (Couverture, profondeur, spécificité de l'hybridation des sondes...)*

### (2) Vérification de la pertinence du variant mis en évidence

*Ne pas laisser passer de faux positifs*

### (3) Revue des bases de données et de la littérature pour le classer

*Orienter sur la suite du parcours de soin (oncogénétique, suite thérapeutique ...)*

# Vérification de la pertinence du variant

- $35 < \text{Nombre de variants} < 55$  : **OK**
- Nombre de variants plus élevé : **possibles artefacts dus à la qualité de l'ADN extrait (dégradation, surfixation...)**
  - *Ré-extraction avec une autre méthode ou autre prélèvement*
  - *Puis Re-NGS*

## CONCLUSION

L'analyse des gènes du système de réparation de l'ADN est non contributive en raison de la qualité faible de l'ADN extrait.

Une nouvelle tentative est en cours, un CR ultérieur vous sera adressé

**OU** un autre prélèvement serait nécessaire

# Interprétation des mutations (=variants)

## Interprétation en trois temps

### (1) Vérification de la qualité de l'analyse

*Paramètres techniques (Couverture, profondeur, spécificité de l'hybridation des sondes...)*

### (2) Vérification de la pertinence du variant mis en évidence

*Ne pas laisser passer de faux positifs*

# Interprétation des mutations (=variants)

## RESULTATS

Variant pathogènes (classe 5) :

Gène	Référence	Variant	Altération protéique	Fréq. allélique	Profondeur
<i>BRCA2</i>	NM_000059	c.2809C>T	p.(Gln937*)	75.2 %	1025 X
<i>TP53</i>	NM_000546	c.129_136del	p.(Leu43Phefs*6)	70.9 %	5334 X

- **Variant et altération de la protéine** = nomenclature de la mutation
  - Faux sens (change un acide aminé)
  - Non sens (insère un codon STOP)
  - Décalant le cadre de lecture (Frameshift)
- **VF%** = fréquence allélique de la mutation
  - comparer avec les VF des autres mutations
  - vérifier le pourcentage de cellules tumorales
- **Profondeur** (nombre de fois où le locus de la mutation a été séquencée (lue))
  - doit être > 500 X
  - pour toute valeur < 500X, vérification visuelle sur IGV

# Interprétation des mutations (=variants)

## Interprétation en trois temps

### (1) Vérification de la qualité de l'analyse

*Paramètres techniques (Couverture, profondeur, spécificité de l'hybridation des sondes...)*

### (2) Vérification de la pertinence du variant mis en évidence

*Ne pas laisser passer de faux positifs*

### (3) Revue des bases de données et de la littérature pour le classer

*Orienter sur la suite du parcours de soin (oncogénétique, suite thérapeutique ...)*

- OncoKB
- ClinVAR
- Varsome
- GnomAD
- LoVD
- Umd.be
- ...



#### Pathogénicité du variant

**Classe 5**

Pathogène

**Classe 4**

Probablement pathogène

**Classe 3**

Signification inconnue (VSI)

**Classe 2**

Probablement bénin

**Classe 1**

Bénin

# Interprétation des mutations (=variants)

## RESULTATS

### Variant pathogènes (classe 5) :

Gène	Reference	Variant	Altération protéique	Fréq. allélique	Profondeur
<i>BRCA2</i>	NM_000059	c.2809C>T	p.(Gln937*)	75.2 %	1025 X
<i>TP53</i>	NM_000546	c.129_136del	p.(Leu43Phefs*6)	70.9 %	5334 X

### Variant de signification inconnue (UV) :

Gène	Reference	Variant	Altération protéique	Fréq. allélique	Profondeur
<i>BRCA2</i>	NM_000059	11 c.6265G>A	p.(Glu2089Lys)	32.6 %	2525 X
<i>CDK12</i>	NM_016507	13 c.3533C>G	p.(Ser1178Cys)	28.5 %	8347 X

### Gènes pour lesquels aucune anomalie cliniquement significative n'a été détectée :

*ATM, BARD1, BRCA1, BRIP1, CHEK1, CHEK2, FANCA, FANCD2, FANCL, MRE11, NBN, PPP2R2A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L.*

# Interprétation des mutations (=variants)

Exemple du variant *p.(Gln937\*)* de *BRCA2*

Pathogène - classe 5

## RESULTATS

Variant pathogènes (classe 5) :



Gène	Référence	Variant	Altération protéique	Fréq. allélique	Profondeur
<i>BRCA2</i>	NM_000059	c.2809C>T	p.(Gln937*)	75.2 %	1025 X
<i>TP53</i>	NM_000546	c.129_136del	p.(Leu43Phefs*6)	70.9 %	5334 X

Variant de signification inconnue (UV) :

Gène	Référence	Variant	Altération protéique	Fréq. allélique	Profondeur
<i>BRCA2</i>	NM_000059	11 c.6265G>A	p.(Glu2089Lys)	32.6 %	2525 X
<i>CDK12</i>	NM_016507	13 c.3533C>G	p.(Ser1178Cys)	28.5 %	8347 X

**Gènes pour lesquels aucune anomalie cliniquement significative n'a été détectée :**

*ATM, BARD1, BRCA1, BRIP1, CHEK1, CHEK2, FANCA, FANCD2, FANCL, MRE11, NBN, PPP2R2A, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L.*

## CONCLUSION

*Adénocarcinome séreux de haut grade ovarien (Tumeur primitive)*

**Présence de la mutation *p.(Gln937\*)* du gène *BRCA2* : cette altération confère une sensibilité aux inhibiteurs de PARP.**

Quelque soit la situation, toute altération mise en évidence sur la tumeur, doit déclencher la recherche en constitutionnel

# Sommaire

- Introduction : HRD, HRR, létalité synthétique
- Workflow des analyses HRD
- Interprétation des mutations : quel paramètres analyser?
- **Et la suite: analyse du phénotype HRD**
- Conclusion

# Analyse du phénotype HRD



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

## Phase III PAOLA-1/ENGOT-ov25: maintenance olaparib with bevacizumab in patients with newly diagnosed, advanced ovarian cancer treated with platinum-based chemotherapy and bevacizumab as standard of care

Isabelle Ray-Coquard, Patricia Pautier, Sandro Pignata, David Pérol, Antonio González-Martín, Paul Sevelde, Kojiichi Fujiwara, Ignace Vergote, Nicoletta Colombo, Johanna Mäenpää, Frédéric Sello, Jalid Sehouli, Domenica Lorusso, Eva María Guerra Alía, Claudia Lefevre-Plesse, Ulrich Canzler, Alain Lortholary, Fredrik Marmé, Enc Pujade-Lauraine, Philipp Harter

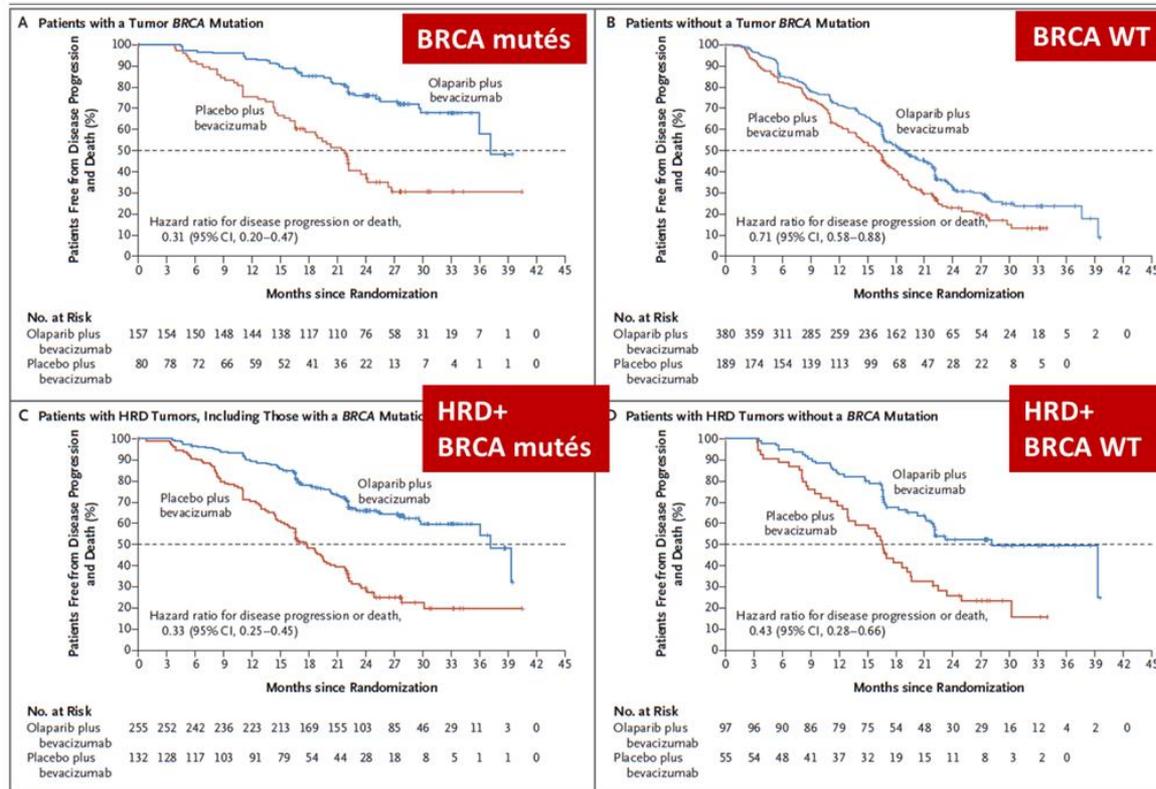


ClinicalTrials.gov identifier: NCT02178141  
This study was sponsored by ARCAVY Research

## Olaparib plus Bevacizumab as First-Line Maintenance in Ovarian Cancer

I. Ray-Coquard, P. Pautier, S. Pignata, D. Pérol, A. González-Martín, R. Berger, K. Fujiwara, I. Vergote, N. Colombo, J. Mäenpää, F. Selle, J. Sehouli, D. Lorusso, E. M. Guerra Alía, A. Reinthaller, S. Nagao, C. Lefevre-Plesse, U. Canzler, G. Scambia, A. Lortholary, F. Marmé, P. Combe, N. de Gregorio, M. Rodrigues, P. Buderath, C. Dubot, A. Burges, B. You, E. Pujade-Lauraine, and P. Harter, for the PAOLA-1 Investigators\*

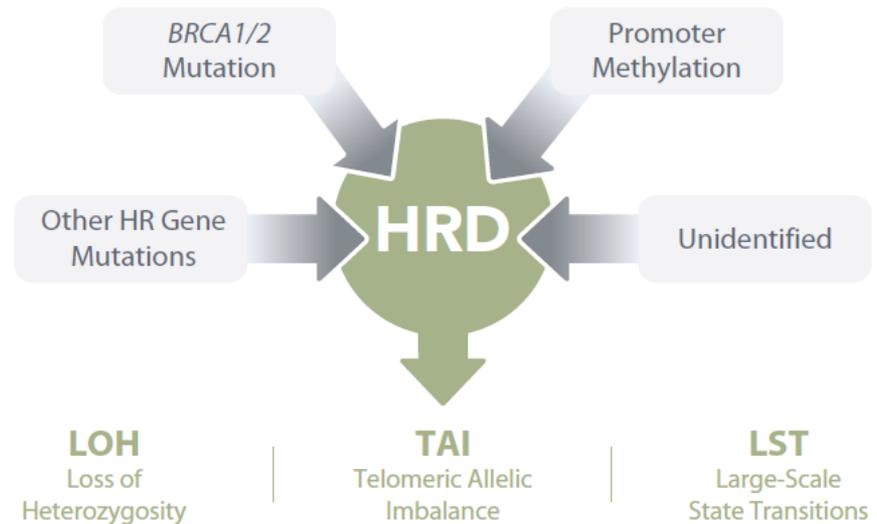
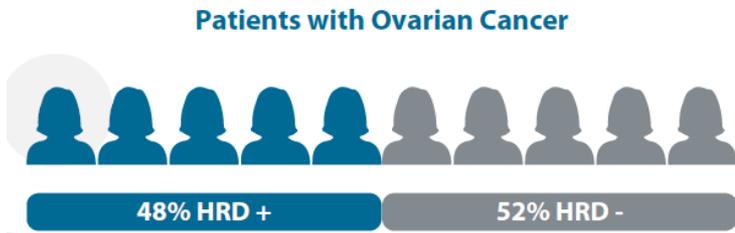
N ENGL J MED 381:25 NEJM.ORG DECEMBER 19, 2019



# Analyse du phénotype HRD



MYRIAD  
myChoice<sup>®</sup>CDx<sup>PLUS</sup>



Evaluating **LOH**, **TAI** and **LST** allows for the assessment of HRD regardless of the specific cause<sup>3</sup>

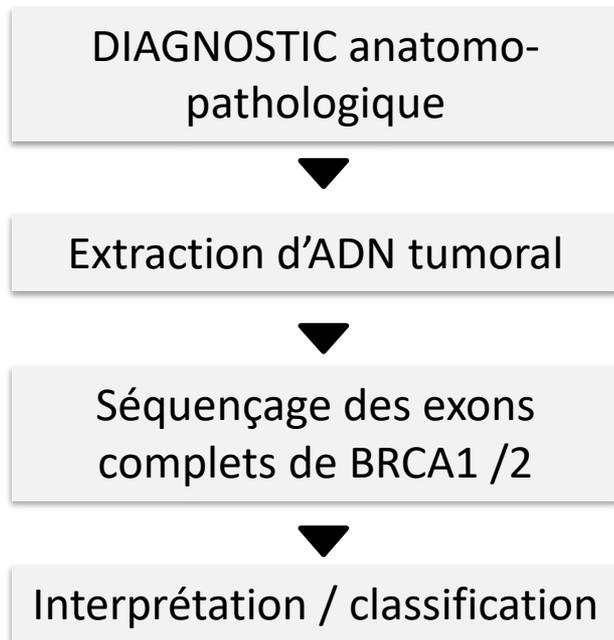
1. Timms et al. Br Ca Res 2014  
2. Baldwin et al. Cancer Research 2000  
3. Norquist et al. JAMA Oncol. 2016

4. The Cancer Genome Atlas. Nature 2011  
5. Watkins et al. Breast Ca Res 2014

# Analyse du phénotype HRD



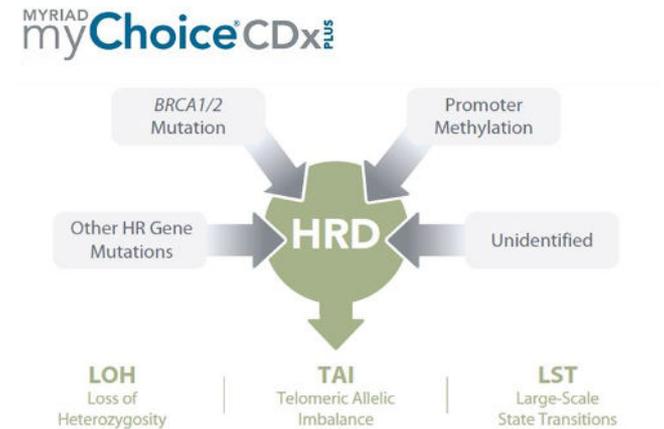
## Workflow des analyses



► Mutation actionnable (GREAT)

NON

OUI



Evaluating **LOH**, **TAI** and **LST** allows for the assessment of HRD regardless of the specific cause<sup>3</sup>

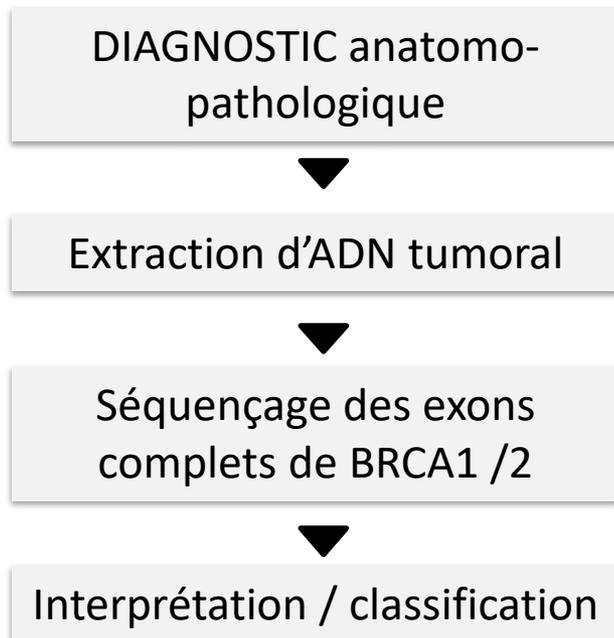
Envoi prélèvement

Adaptation thérapeutique

# Analyse du phénotype HRD



## Workflow des analyses



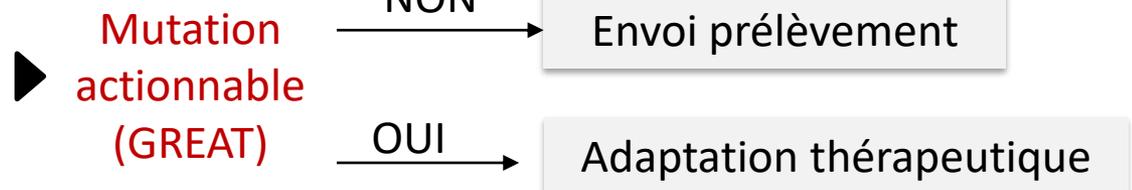
Arrêt de la gratuité du testing MyCHOICE (pris en charge jusque là par AZ)

LOH  
Loss of Heterozygosity

TAI  
Telomeric Allelic Imbalance

LST  
Large-Scale State Transitions

Evaluating **LOH**, **TAI** and **LST** allows for the assessment of HRD regardless of the specific cause<sup>3</sup>



# Analyse du phénotype HRD

## Solutions académiques ou privées (France)

- Les centres doivent prendre une solution validée cliniquement sur les patients d'ENGOTIII (ARCAGY)

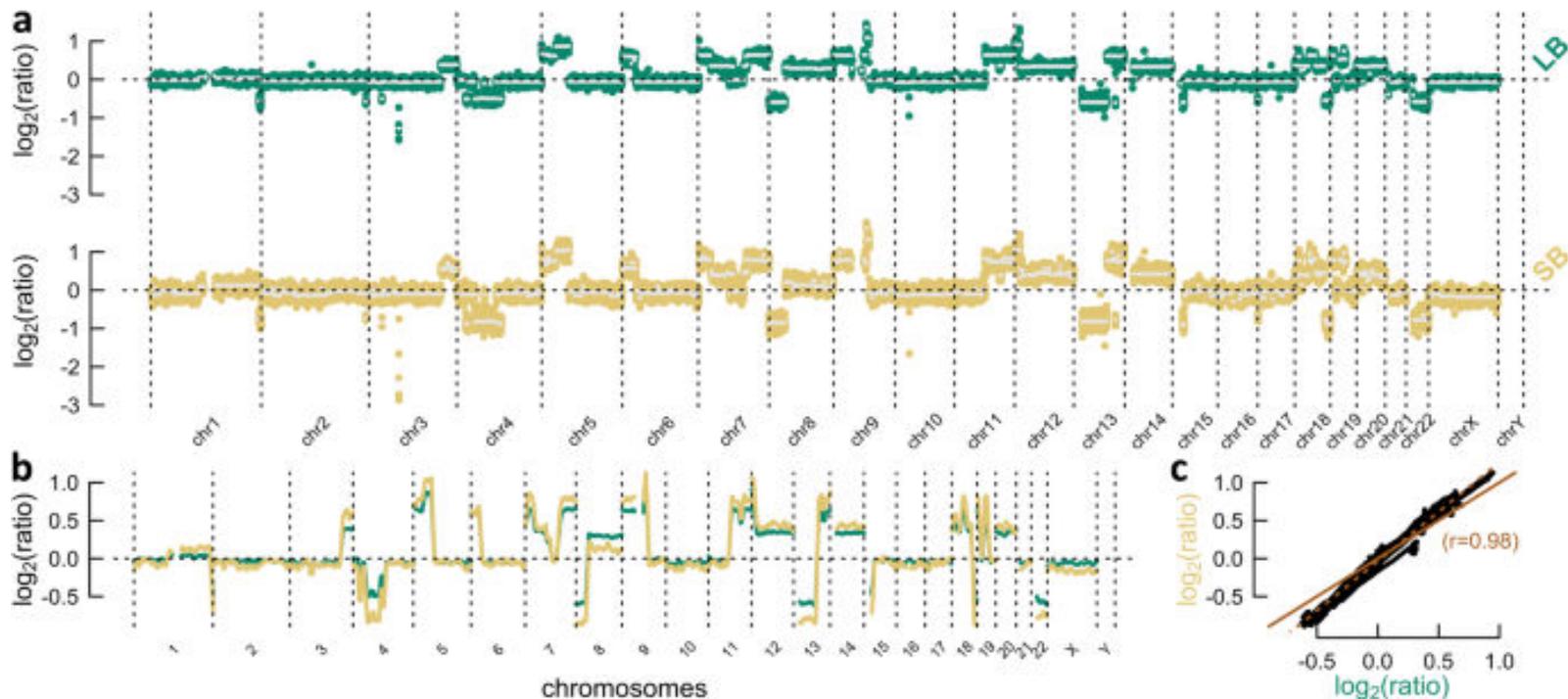
Solution	Académique/Privée	Cout	Génotype Mutations/Del/Ins courtes	Génotype CNV	Phénotype (Cicatrice)-NGS shallow
Myriad (US)	Privée	2400€	OUI	OUI	OUI
Myriad (Dijon (labo satellite))	Privée	2400€	OUI	OUI	OUI
Caen (Unicancer, Dominique VAUR) Panel Agilent	Académique		OUI	OUI	NON
Sophia Genetics	Privée		OUI	OUI	OUI
Institut Curie	Académique				OUI



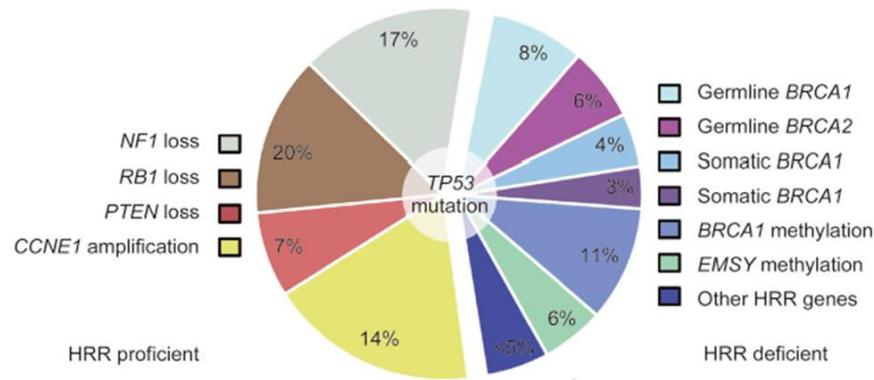
SOLUTION CHOISIE, pipeline de Curie (free) avec notre panel HBOC :  
**Analyse Shallow**

# Brièvement : Shallow sequencing

- Analyse faible profondeur sur génome entier
- En début de séquençage (on récupère un aliquot de solution avant de faire le NGS pour appel de variant sur panel HBOC/HRD)



# ANALYSES : génotype et phénotype

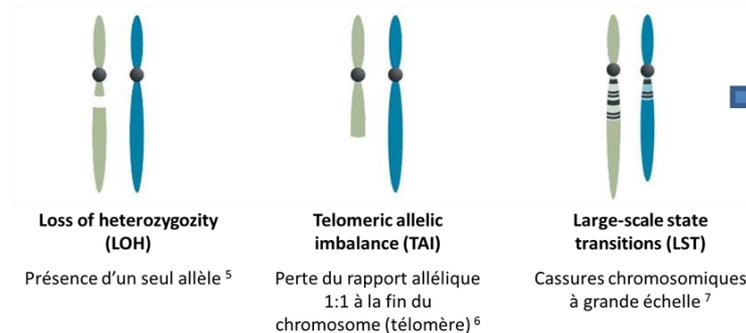


## GENOTYPE

### Recherche d'altérations dans les gènes HRR

- Mutations + délétions/insertions courtes
- CNV
- NGS appel de variants

## CICATRICE GENOMIQUE



## PHENOTYPE

### Visualisation de la cicatrice génomique

- NGS shallow (faible profondeur pour avoir une image de l'ensemble du génome)

# Sommaire

- Introduction : HRD, HRR, létalité synthétique
- Workflow des analyses HRD
- Interprétation des mutations : quel paramètres analyser?
- Et la suite: analyse du phénotype HRD
- **Conclusion**

# Conclusion

## En résumé, actuellement

- Détection des anomalies du système HRR sur 20 gènes par NGS (Sophia Genetics)
- Adaptations thérapeutiques pour les cancers de l'ovaire, du sein, du pancréas, de la prostate
- Panel **UNIQUEMENT tumoral**, en amont de l'analyse constitutionnelle ou en parallèle selon la situation
- ATTENTION: thérapeutique sur sein et pancréas UNIQUEMENT sur mutation constit!
- Envoi de l'analyse HRD à Dijon (Plateforme satellite Myriad)

## A partir de janvier 2023

- Ovaires/pancréas/sein/prostate : réalisation panel HBOC
- Ovaires si pas de mutation BRCA, réalisation Shallow, envoi des données brutes pour analyse à Curie pour ANALYSE HRD

**Remplir une feuille de demande de génotypage adaptée**