

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

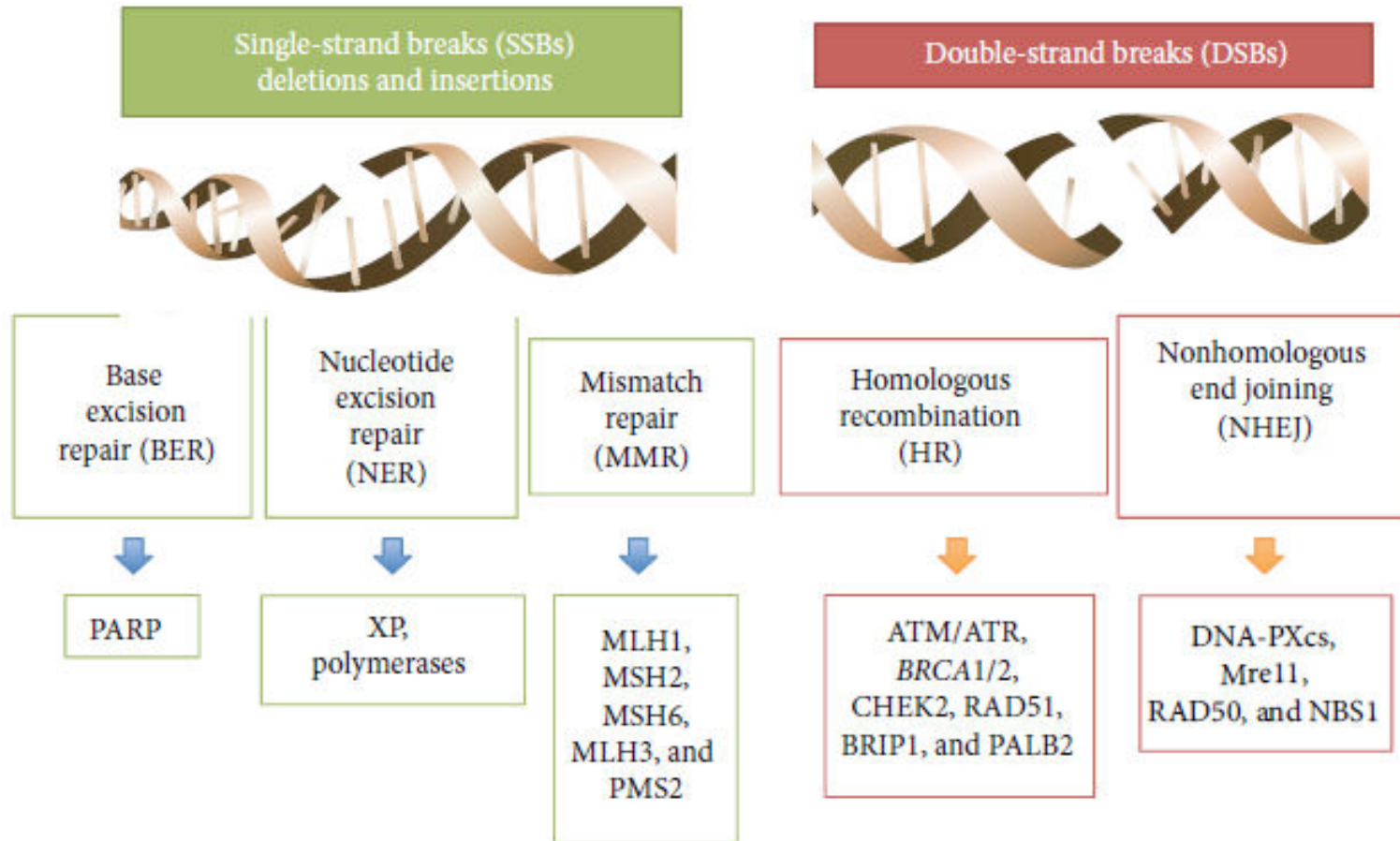
Létalité synthétique : mort cellulaire par combinaison de deux effets

HRR, HRD, létalité synthétique

HRR : Réparation par Recombinaison Homologue

HRD : Homologous Recombination Deficiency

Létalité synthétique : mort cellulaire par combinaison de deux effets

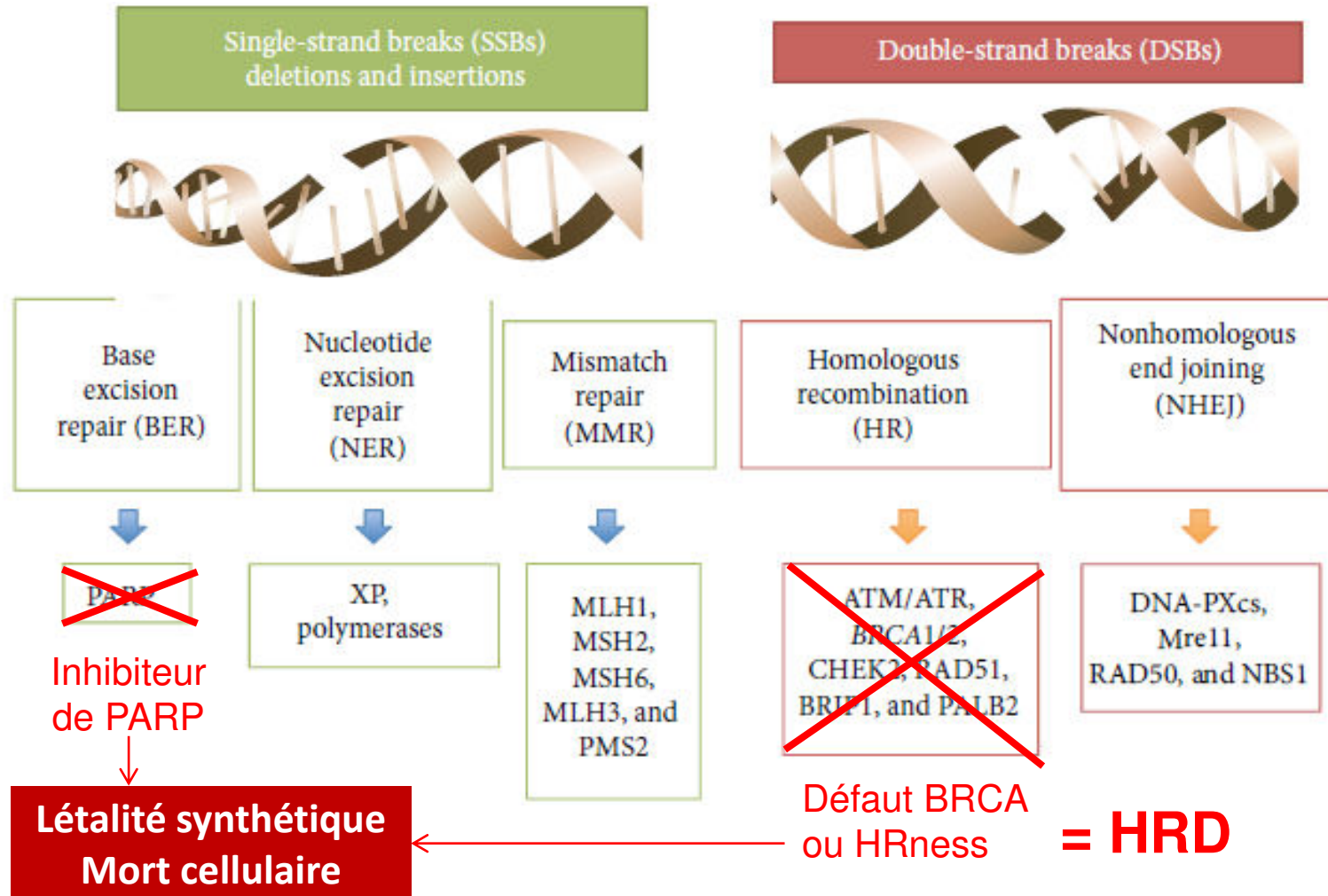


HRR, HRD, létalité synthétique

HRR : Réparation par Recombinaison Homologue

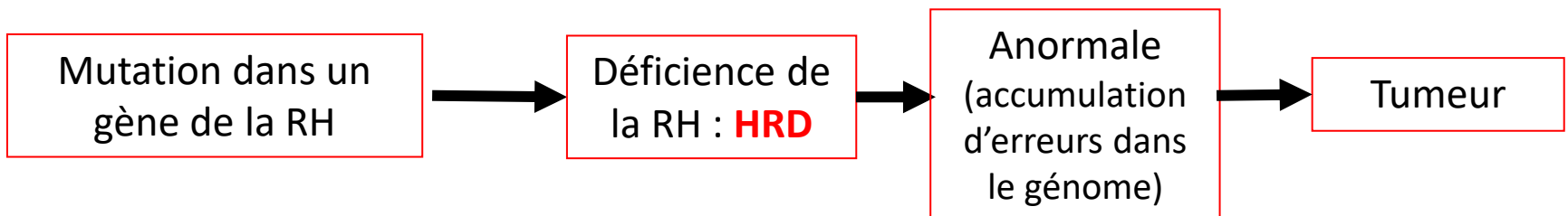
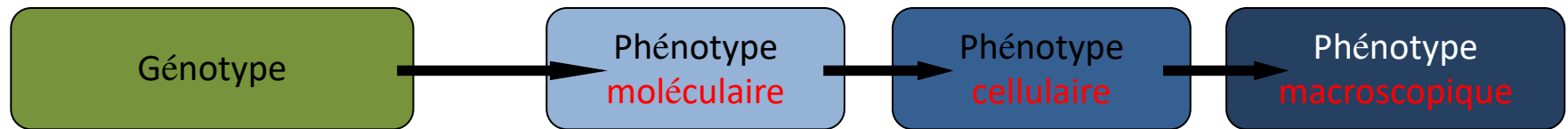
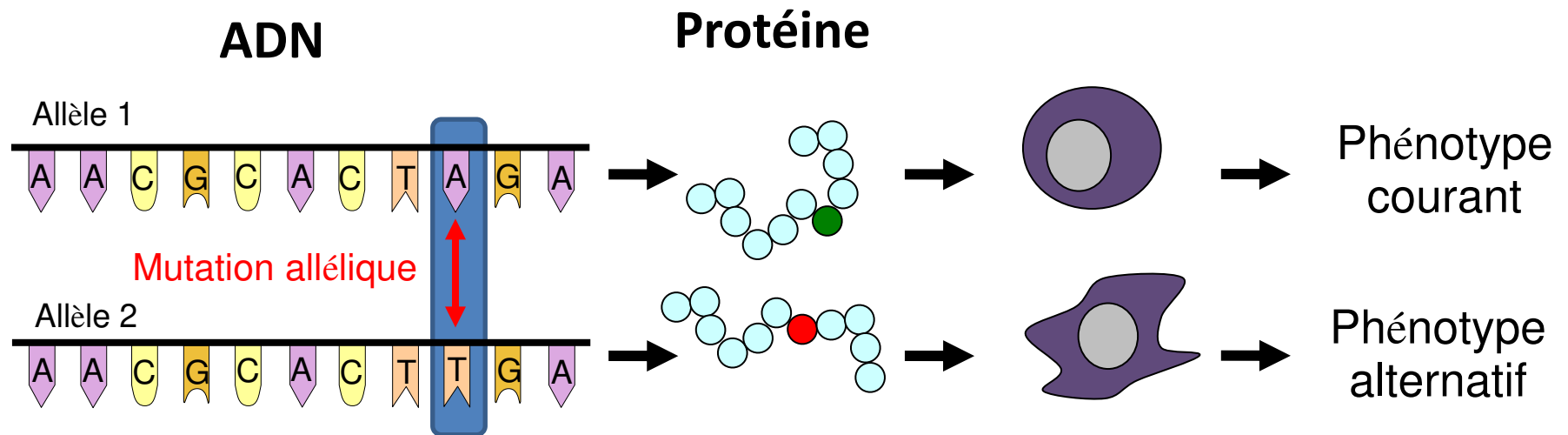
HRD : Homologous Recombination Deficiency

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 entraîner une perte
de la protéine et donc un phénotype HRD

Génotype : anomalies dans les gènes de RH

Hypothèse de Knudson

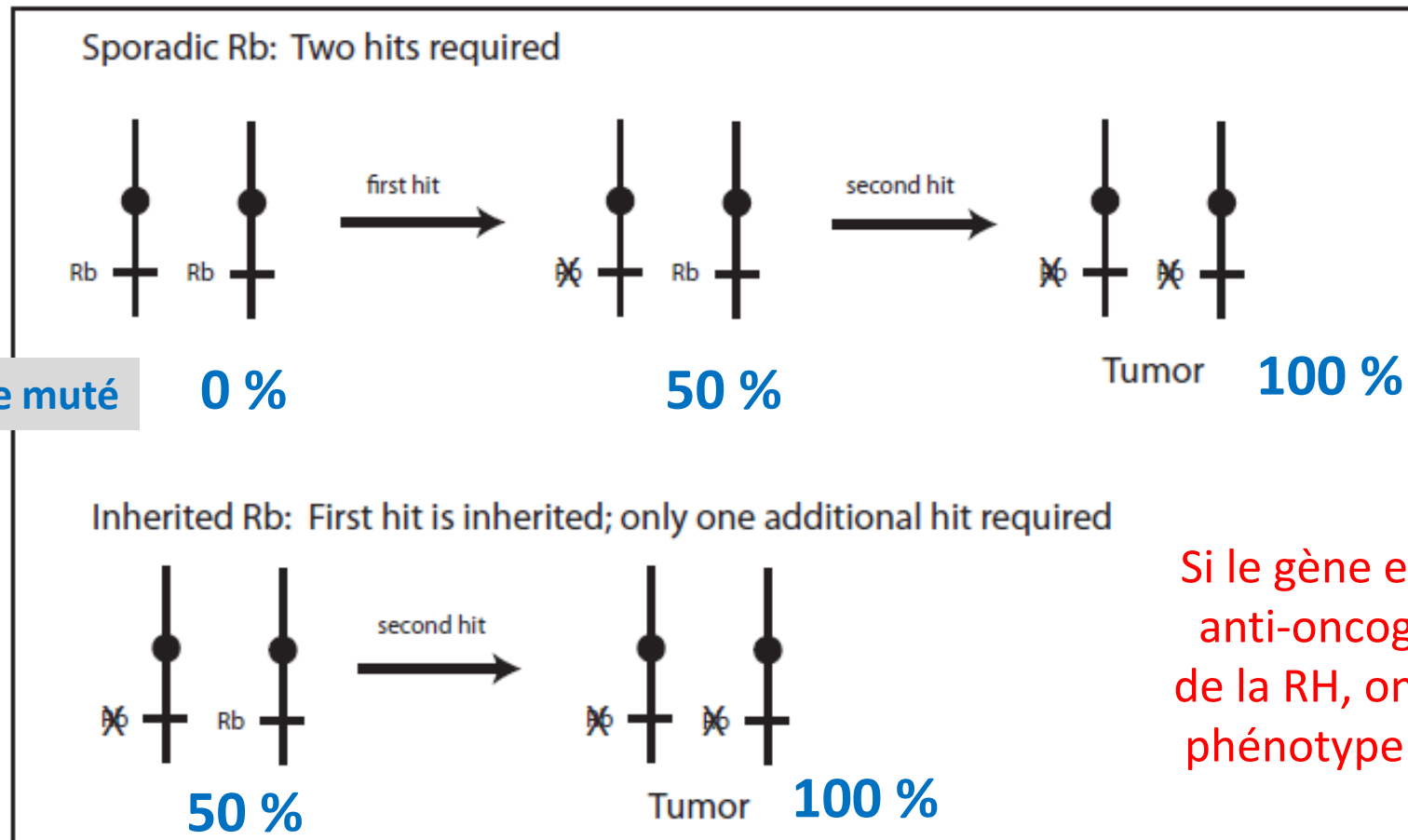


Figure 1. Knudson's two-hit hypothesis for retinoblastoma. In sporadic Rb, both copies of RB1 (RB1) must be inactivated. This requires two mutational events "hits" which each inactivate one copy of RB1. In inherited Rb, the first hit is inherited.

Phénotype cellulaire : conséquences de l'HRD

Cicatrices génomiques +++



Loss of heterozygosity (LOH)

Présence d'un seul allèle ¹



Telomeric allelic imbalance (TAI)

Perte du rapport allélique 1:1 à la fin du chromosome (télomère) ²



Large-scale state transitions (LST)

Cassures chromosomiques à grande échelle ³

¹ 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

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

³ 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 Maria Guerra Alía, Claudia Lefevre-Plesse, Ulrich Canzler, Alain Lortholary, Fredrik Marmé, Enc Pujade-Lauraine, Philipp Harter

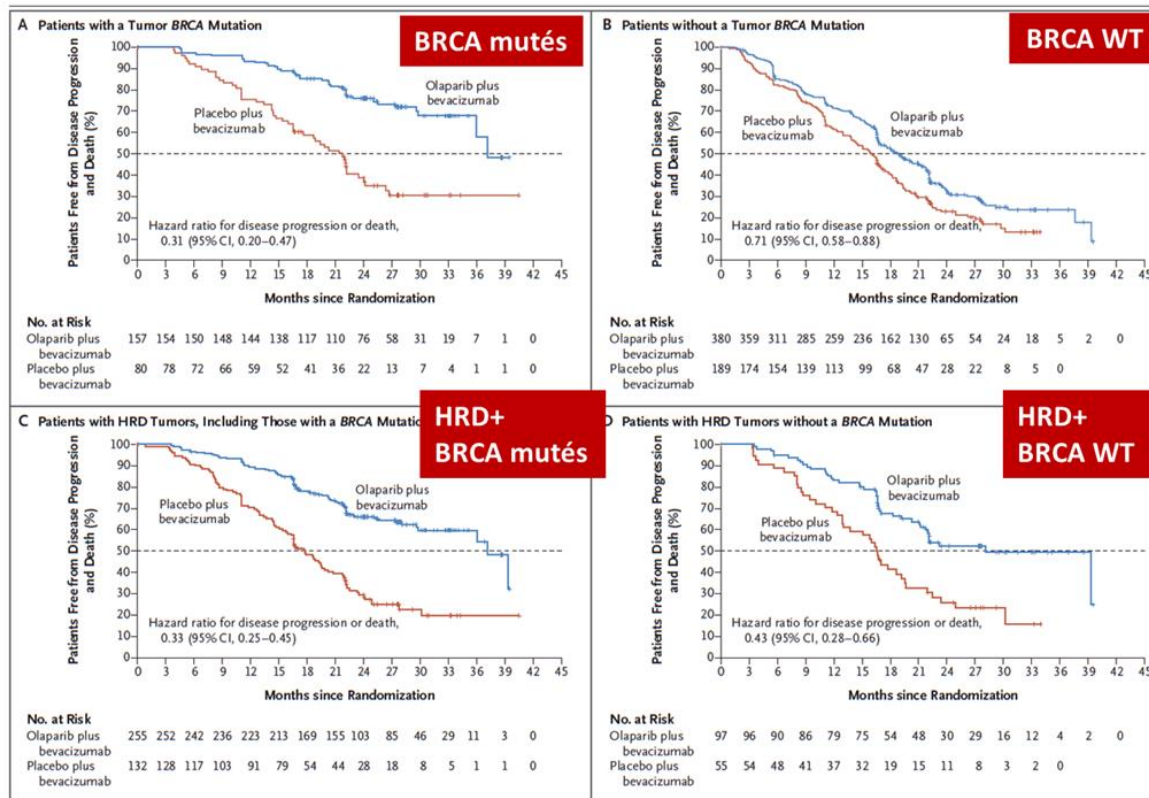


ClinicalTrials.gov identifier: NCT02178141
This study was sponsored by ARCADY Research

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*

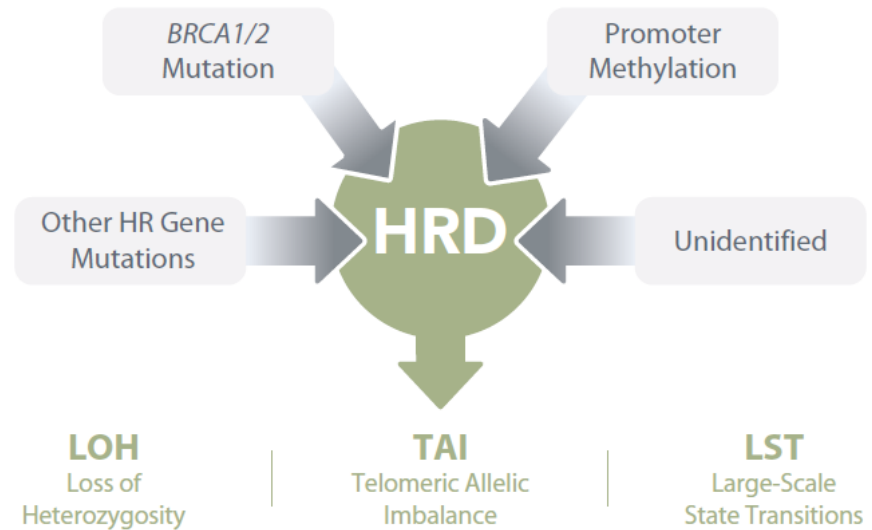
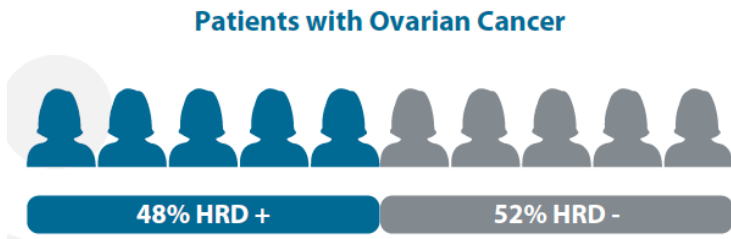
N ENGL J MED 381:25 NEJM.ORG DECEMBER 19, 2019



Analyse du phénotype HRD



MYRIAD
myChoice[®]CDx^{PLUS}



Evaluating **LOH**, **TAI** and **LST** allows for the assessment of HRD regardless of the specific cause³

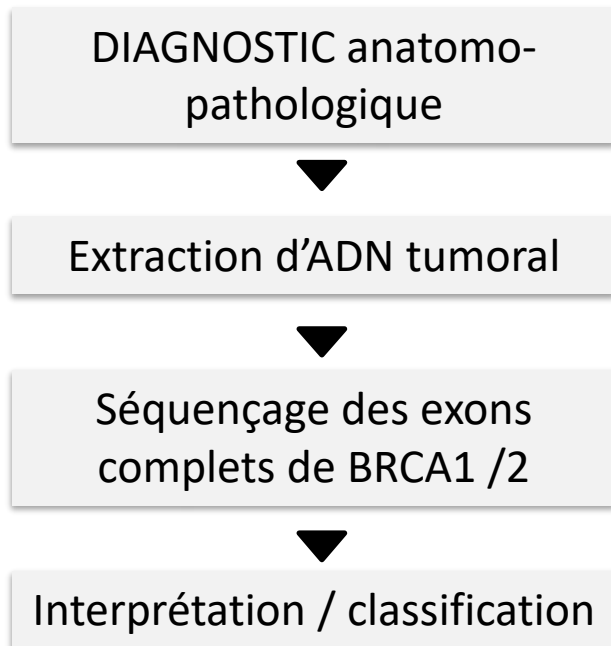
1. Timms et al. Br Ca Res 2014
2. Baldwin et al. Cancer Research 2000
3. Norquist et al. JAMA Oncol. 2016

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

Analyse du phénotype HRD



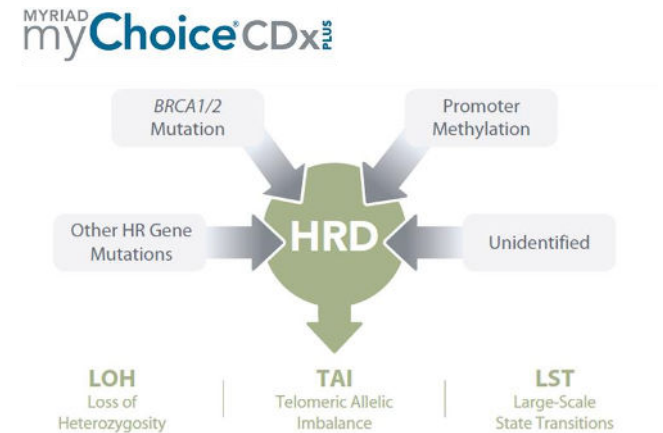
Workflow des analyses



► Mutation actionnable (GREAT)

NON →

OUI →



Evaluating **LOH**, **TAI** and **LST** allows for the assessment of HRD regardless of the specific cause³

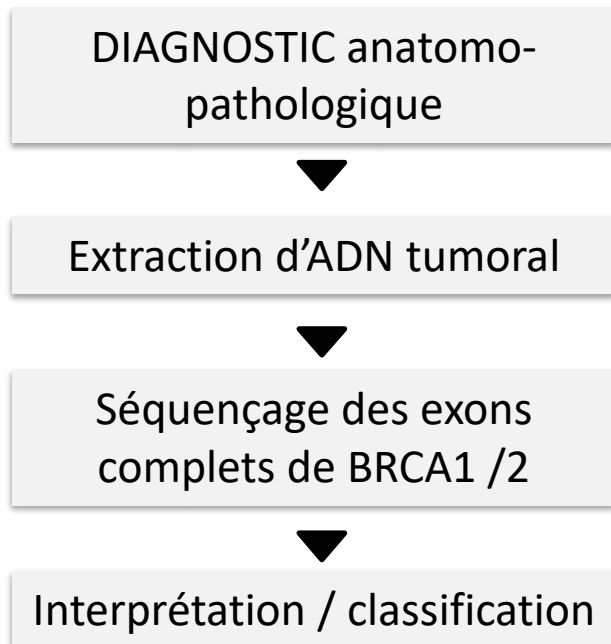
Envoi prélèvement

Adaptation thérapeutique

Analyse du phénotype HRD



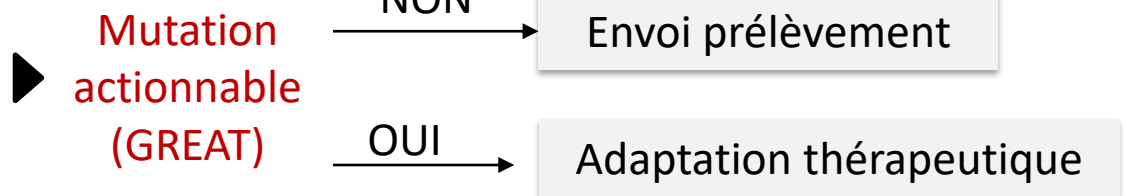
Workflow des analyses



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 cause³



Analyse du phénotype HRD

Solutions académiques ou privées (France)

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

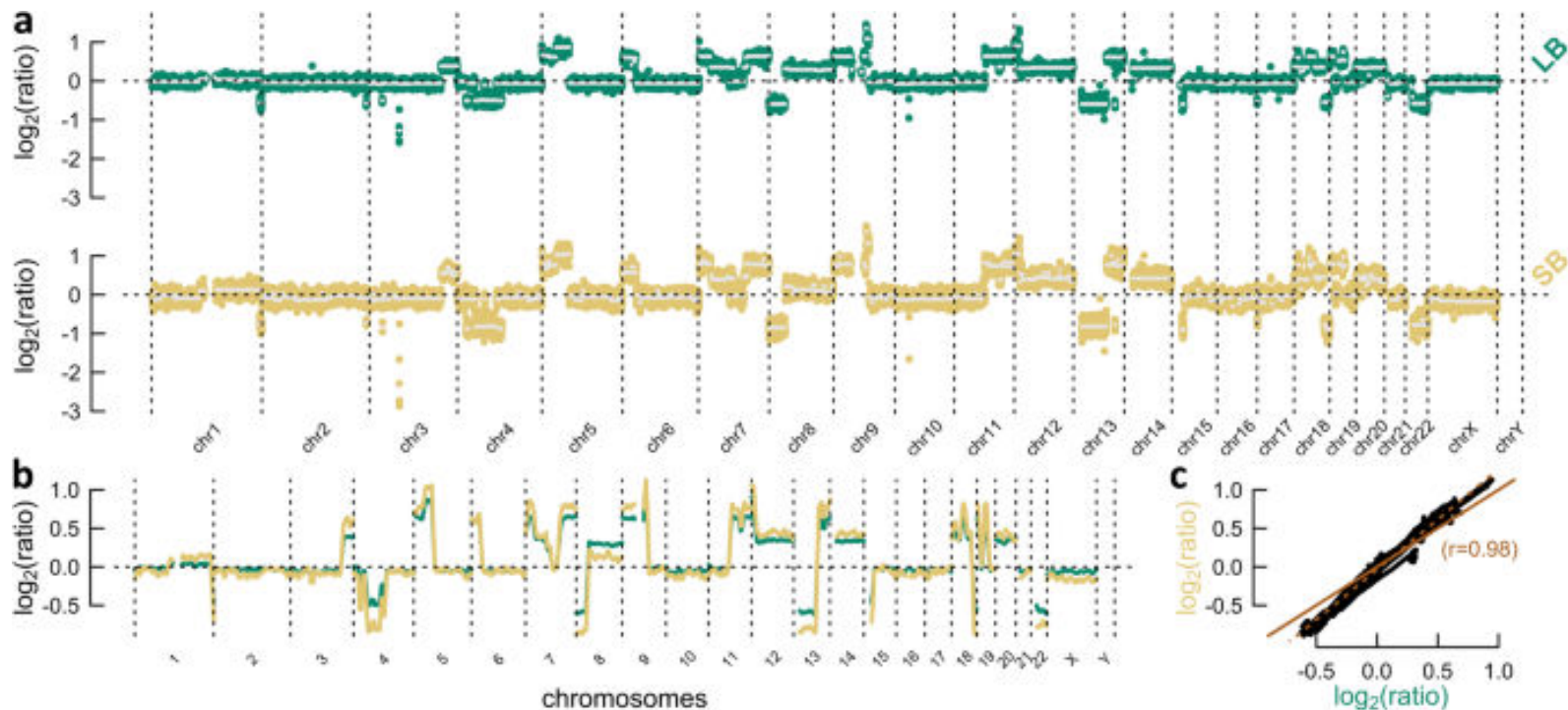
Solution	Académique/Privée	Cout	Génotype Mutations/Del/Ins courtes	Génotype CNV	Phénotype (Cicatrice)-NGS shallow
Myriad (US)	Privée	2400€	OUI	OUI	OUI
Myriad (Dijon (labo satellite))	Privée	2400€	OUI	OUI	OUI
Caen (Unicancer, Dominique VAUR) Panel Agilent	Académique		OUI	OUI	NON
Sophia Genetics	Privée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



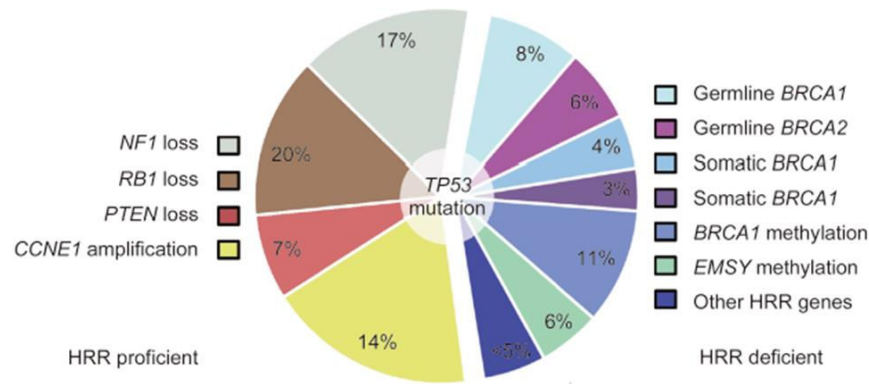
SOLUTION CHOISIE, pipeline de Curie (free) avec notre panel HBOC :
Analyse Shallow

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

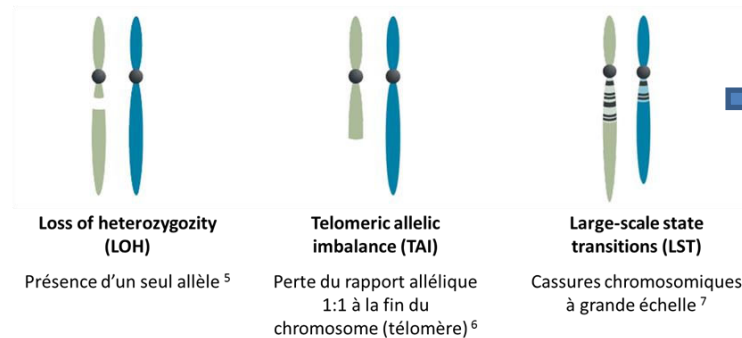


GENOTYPE

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