

Accès précoce en cours en oncologie thoracique et techniques de biologie moléculaire (partie II)

- 5^È rencontre d'oncologie thoracique en oncologie thoracique

21 Novembre 2025

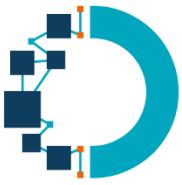
Angoulême

Emilie TOULZA

Pharmacien – Institut Bergonié

Charline CAUMONT

Biogiste – CHU Bordeaux



Liens d'intérêts

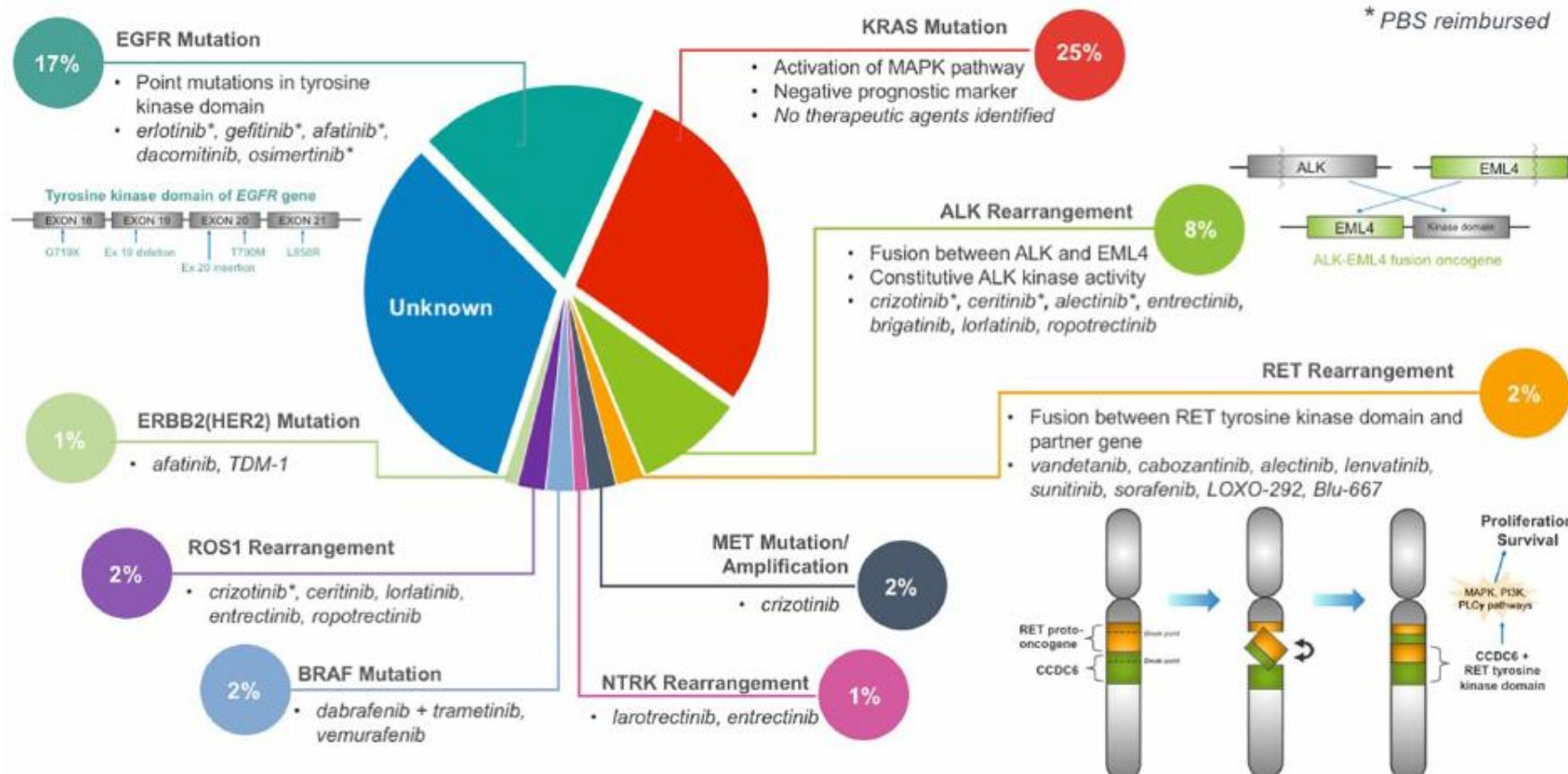
- AstraZeneca
- Pfizer
- Roche
- Boehringer-Ingelheim
- MSD

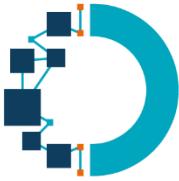


CBNPC

Quelles anomalies moléculaires ?

Common Genomic Alterations in Lung Adenocarcinoma





Accès précoce

Oncologie thoracique

CBPNC

Stade localement avancé/non résécable

Osimertinib

EGFR

Del19 / L858

Stade métastatique

Amivantamab

Telisotuzumab
Vedotin

CBPC

Stade limité

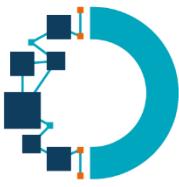
Durvalumab

EGFR

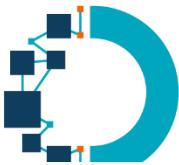
Ins20 1L
Del19/L858R après
échec ITK 3G

MET

Surexpression
Amplification
EGFR WT



Détection des mutations de l'*EGFR*



Biologie moléculaire : techniques ciblées

« circuit rapide »



J1: Réception/Enregistrement/
Sélection/Extraction ADN

J2: Extraction + Dosage ADN

J3-J5: Analyse + CR

- Technique ciblée COBAS®: recherche de certaines mutations EGFR
- >10% cellules tumorales

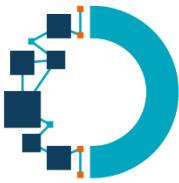
Exons	Mutations détectées
Exon 18	G719X (G719A, G719C et G719S)
Exon 19	délétions et mutations complexes (intéressant la région comprenant les codons 745 à 753)
Exon 20	T790M, S768I et insertions
Exon 21	L858R et L861Q



Coupes – Copeaux
Analyse

- Technique ciblée IDYLLA®: recherche de certaines mutations EGFR
- >10%-20% cellules tumorales
- Perte de matériel - pas de récupération de l'ADN
- Consommation de matériel +++
- Attention à l'interprétation (CQ à vérifier en systématique)





Techniques à privilégier selon les anomalies moléculaires à rechercher

Recommandations de l'INCa

	ANOMALIES RECHERCHÉES	TECHNIQUE
Altérations à rechercher	Mutations d' <i>EGFR</i> (exons 18 à 21)	NGS ADN
	Mutations de <i>BRAF</i>	
	Mutations de <i>KRAS</i>	
	Mutations d' <i>HER2/ERBB2</i>	
	Saut de l'exon 14 de <i>MET</i>	
	Fusions impliquant <i>ALK</i>	NGS ARN
	Fusions impliquant <i>ROS1</i>	
	Fusions impliquant <i>RET</i>	
	Fusions impliquant <i>NTRK</i>	
Altérations émergentes à discuter	Amplifications de <i>MET</i> ou <i>HER2/ERBB2</i>	NGS ADN
	Mutations de <i>TP53</i> , <i>STK11</i> et <i>KEAP1</i>	
	Fusions de <i>NRG1</i>	NGS ARN



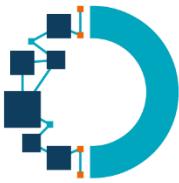
JANVIER 2023

RECOMMANDATIONS ET RÉFÉRENTIELS

PATIENTS ATTEINTS D'UN CANCER BRONCHIQUE NON À PETITES CELLULES

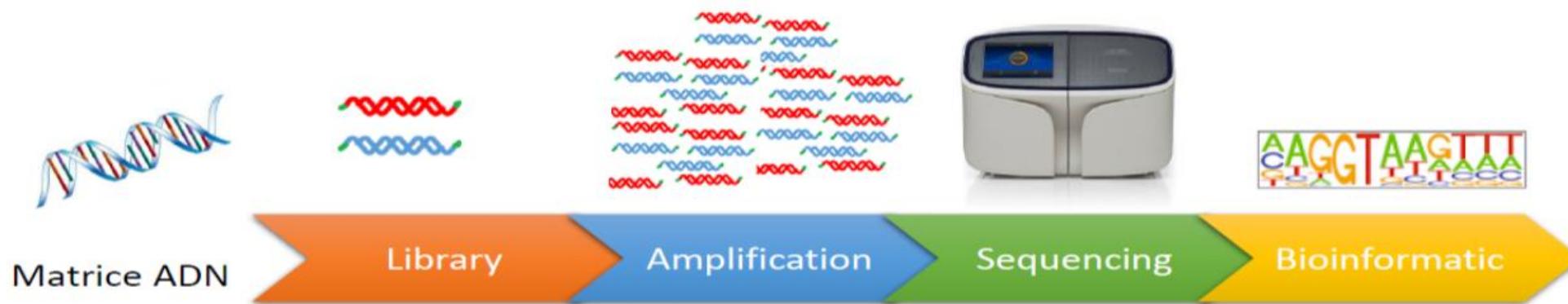
/ Indications des tests moléculaires en vue de la prescription de traitements de précision

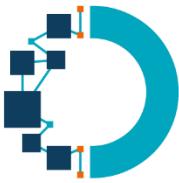




NGS ADN

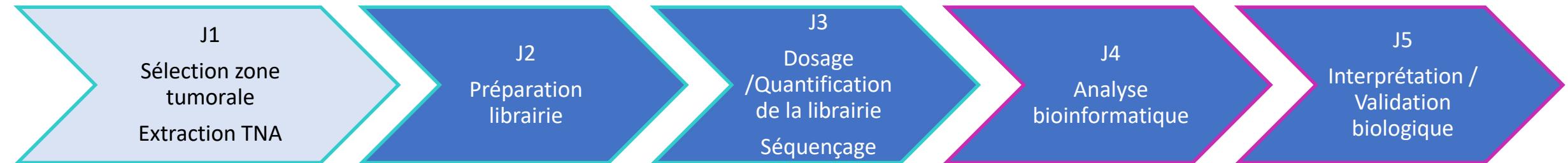
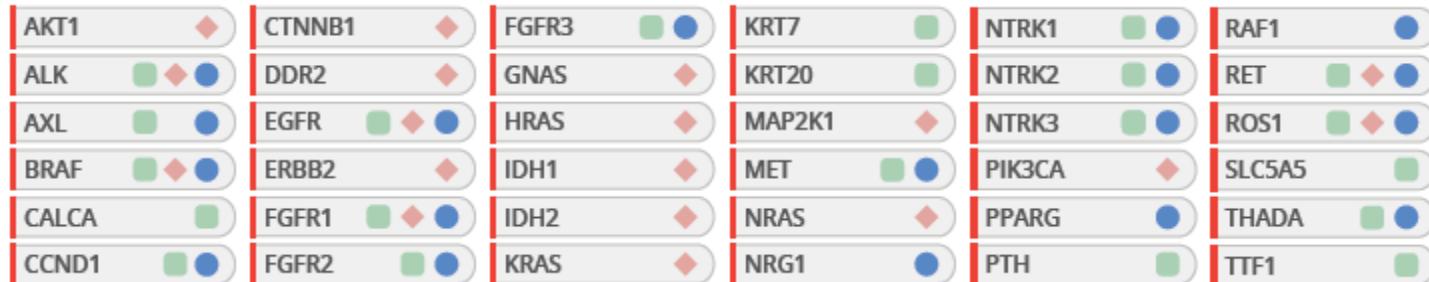
- Recherche simultanée en PCR multiplexe des cibles moléculaires poumon (EGFR, BRAF, KRAS, ERBB2, PIK3CA, MET, STK11,...) et autres tumeurs solides
- Extraction ADN (punch ou 2-3 lames 20µm)
- Avantage du NGS : Analyse simultanée des différentes cibles / analyse séquentielle ou hiérarchisée





RNAseq ciblé

Archer FusionPlex®

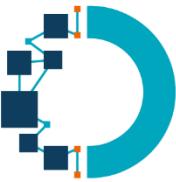


- 1 série d'extraction TNA/ARN par semaine
- 2 séries NGS Archer / semaine au CHU
- 60 à 96 échantillons par run d'analyse

Partie wet-lab

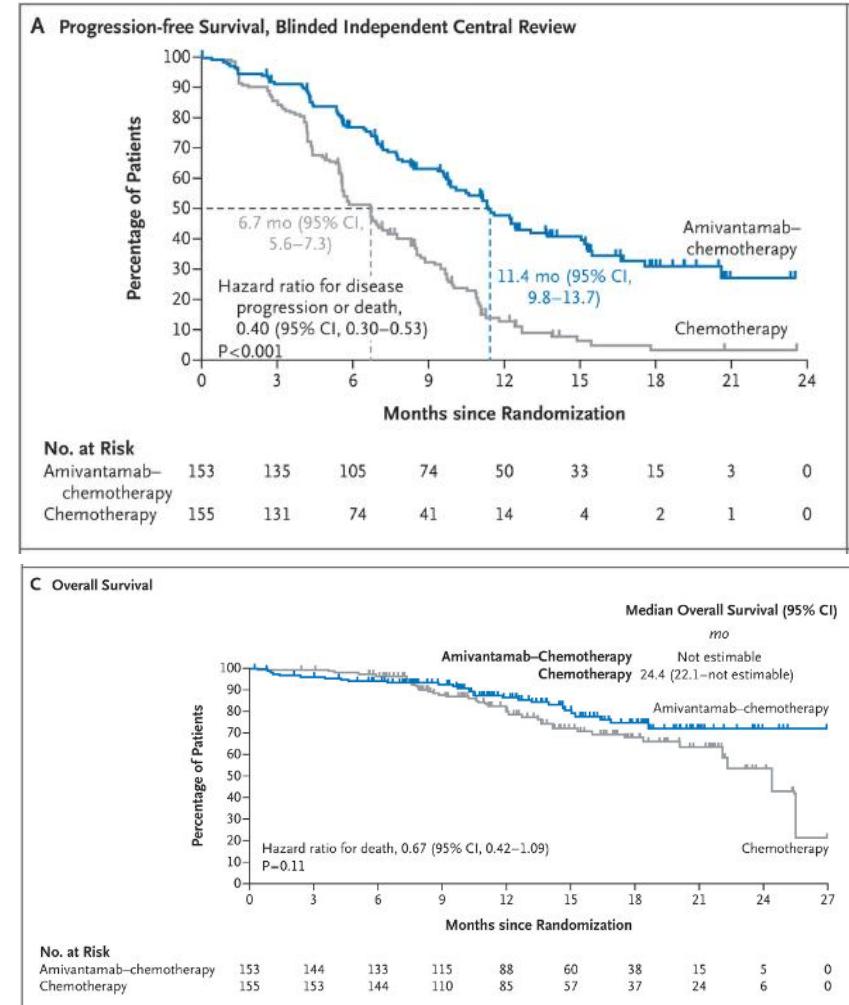
Partie dry-lab

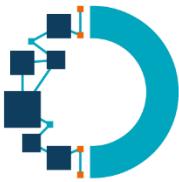
Programmation technique BM -> diffusion résultat:
12 à 15 jours ouvrés (2 semaines)



Focus: Insertions en phase dans l'exon 20 d'EGFR

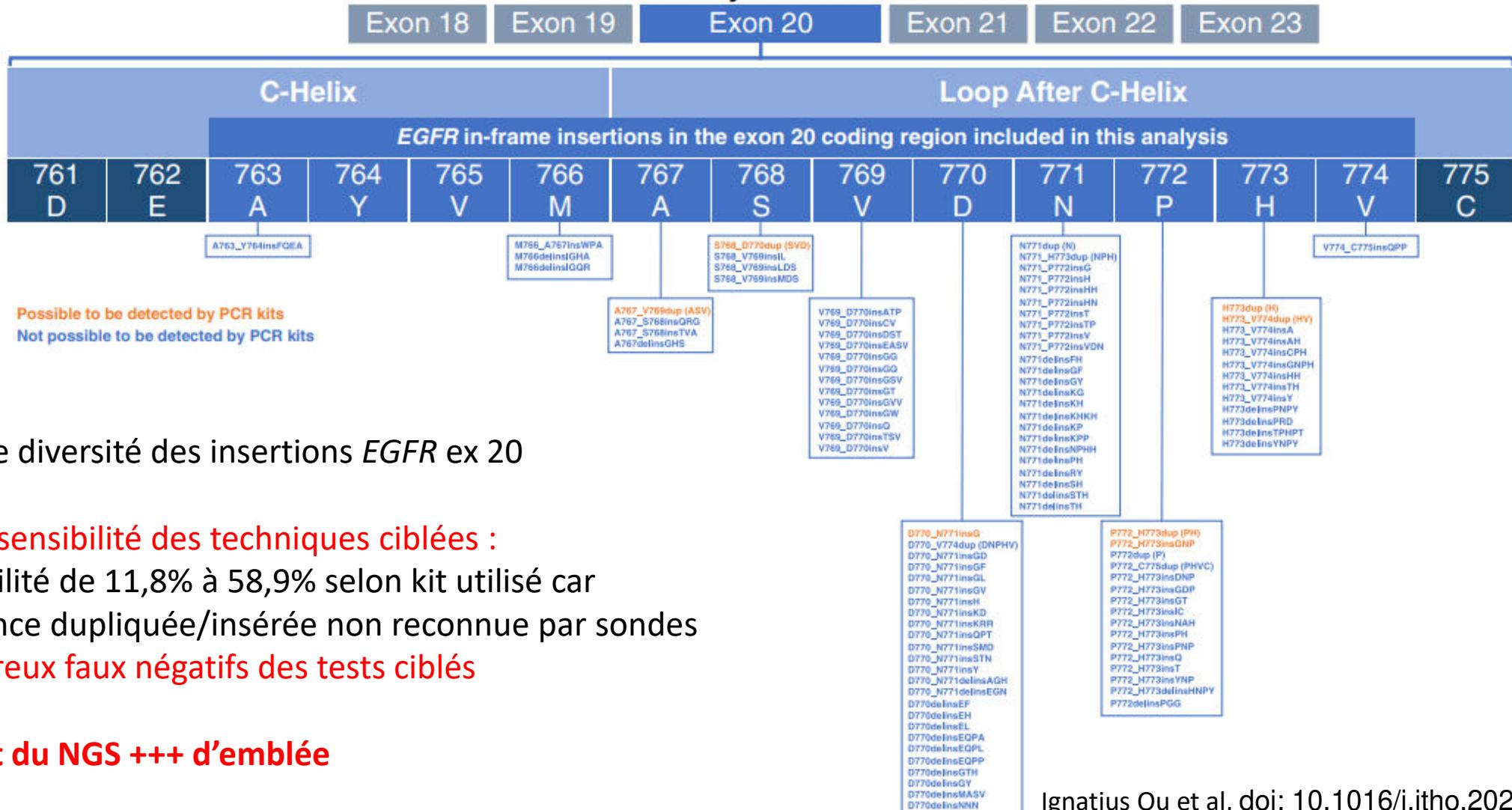
- 5-10% des mutations *EGFR* dans les CBNPC.
- Mécanisme d'activation sans changement d'affinité à l'ATP (faiblesse des TKI classiques)
- Alternative: Amivantamab (anticorps bi-spécifique anti EGFR/MET)
 - ✓ Données de phase IIII (étude PAPILLON) en 1L:
 - ✓ Bénéfice en PFS et OS de la Combinaison amivantamab + chimiothérapie versus chimiothérapie seule





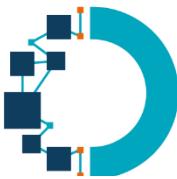
Focus: Insertions en phase dans l'exon 20 d'EGFR

EGFR Tyrosine Kinase Domain



- Grande diversité des insertions *EGFR* ex 20
 - **Faible sensibilité des techniques ciblées :**
 - Sensibilité de 11,8% à 58,9% selon kit utilisé car séquence dupliquée/insérée non reconnue par sondes
 - **Nombreux faux négatifs des tests ciblés**
 - **Intérêt du NGS +++ d'emblée**

Ignatius Ou et al. doi: 10.1016/j.itho.2023.01.086.



Mutation EGFR exon 20

En pratique

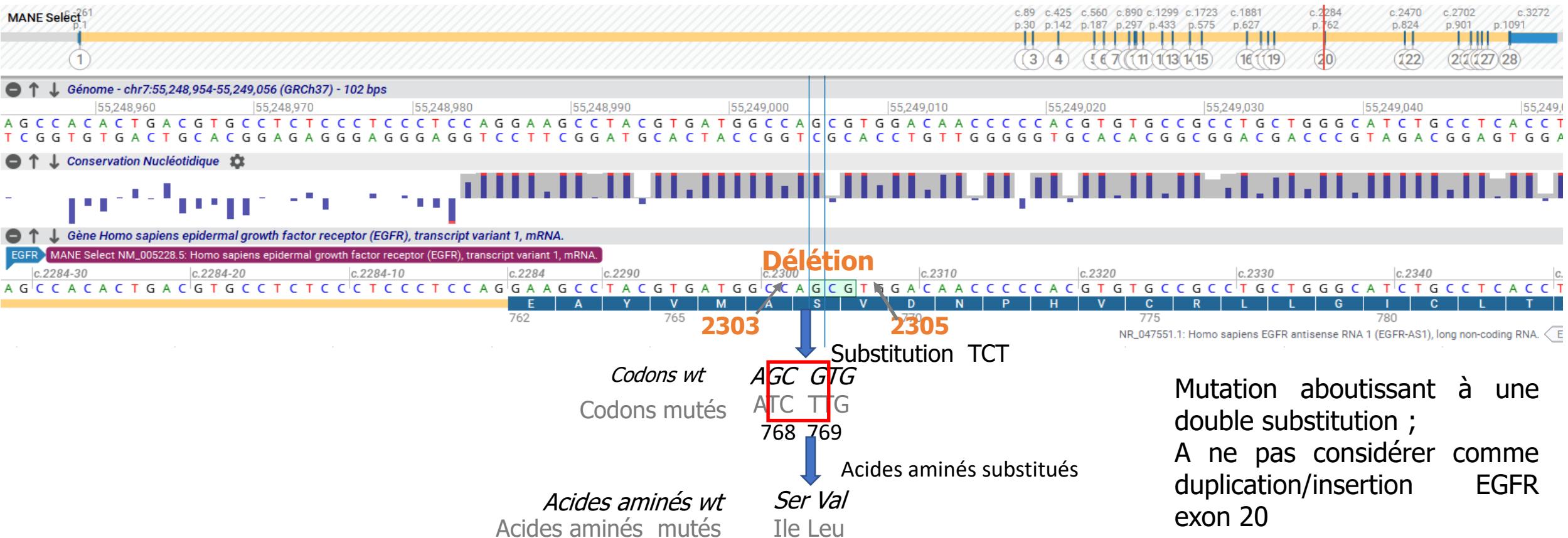
Vue générale du transcrit NM_005228.5 (EGFR)

EGFR - Epidermal growth factor receptor | GRCh37 (Chr 7) |

gnomAD SCORES

OMIM®

BRIDGES

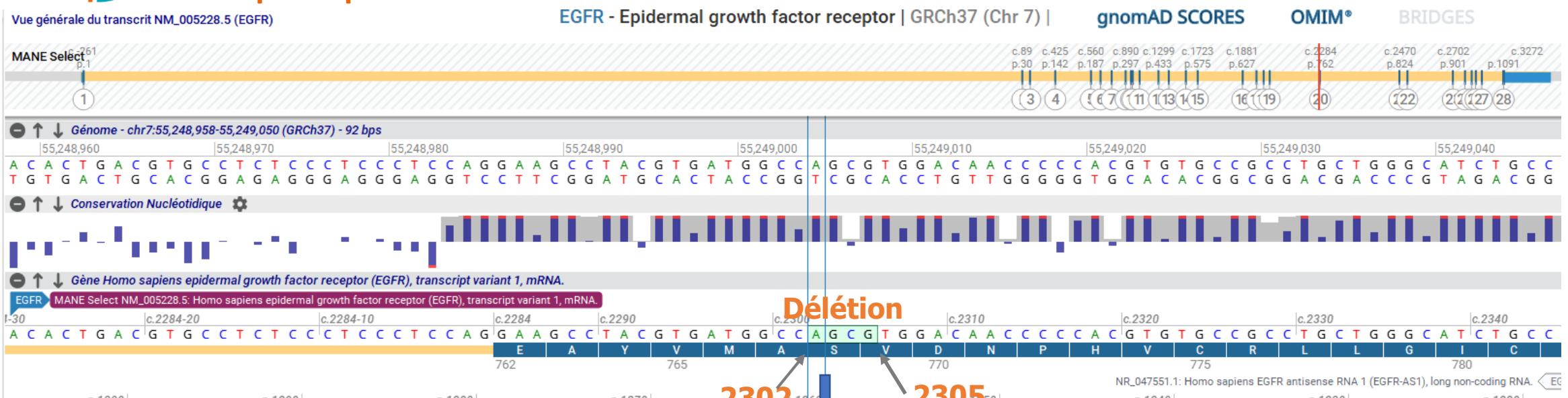




Mutation EGFR exon 20

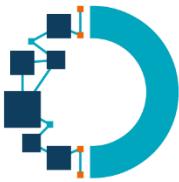
En pratique

Vue générale du transcript NM_005228.5 (EGFR)



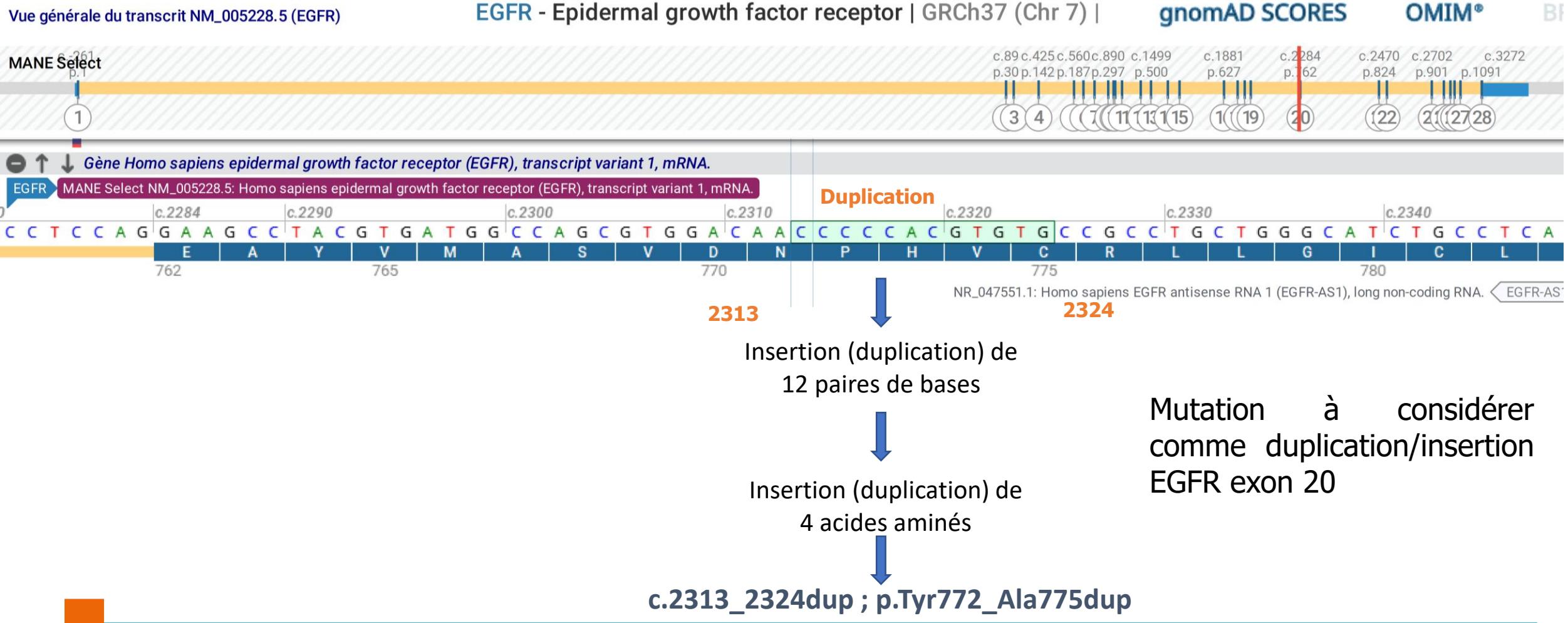
c.2302_2305delinsCCGC ; p.Ser768_Val769delinsProLeu

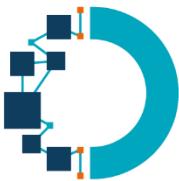
Mutation aboutissant à une double substitution ;
A ne pas considérer comme duplication/insertion EGFR exon 20



Mutation EGFR exon 20

En pratique





Cas pratique

Analyse technique ciblée

- Biopsie pleurale chirurgicale :
Adénocarcinome d'origine pulmonaire
 - ALK- et ROS1-
 - PDL1 2%
 - Statut EGFR muté

Résultat du Test (1) Dispositif de Diagnostic Médical In Vitro. Utilisation réservée aux procédures de diagnostic.

Idylla™ EGFR Mutation Test

GENOTYPE EGFR	
G719A/C/S	MUTATION DÉTECTÉE
Changement de protéine	p.Gly/19Ala / p.Gly/19Cys ; p.Gly/19Cys(2) / p.Gly719Ser
Changement de nucléotide	c.2156G>C / c.2155G>T ; c.2154_2155delinsTT / c.2155G>A
INSERTION DE L'EXON 20	MUTATION DÉTECTÉE
Changement de protéine	Cf. Instructions d'utilisation - Interprétation des résultats
Changement de nucléotide	Cf. Instructions d'utilisation - Interprétation des résultats
L861Q	MUTATION DÉTECTÉE
Changement de protéine	p.Leu861Gln
Changement de nucléotide	c.2582T>A



RAPPORT DES RÉSULTATS DU TEST



L858R	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
SUPPRESSION DE L'EXON 19	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
T790M	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
S768I	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
CO DU CONTRÔLE EGFR	18.4



Cas pratique

Analyse NGS

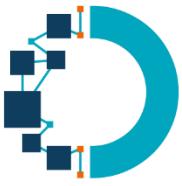
Résultats NGS :

Mutation **c.2155G>T; p.Gly719Cys (G719C)**
dans l'exon 18 du gène *EGFR*

Mutation **c.2582T>A ; p.Leu861Gln (L861Q)**
dans l'exon 21 du gène *EGFR*.

Mutations toutes deux clonales et portées a priori par le même allèle, et toutes deux sensibles aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR.

	NP_005219.2:p.Gly719Cys	
Gene:	EGFR	Location: chr7:55241707
Ref./ Mutation:	G / T (. PRESENT)	Depth: 8291
Allele Fraction:	0.539983	Clinical Sig. Pathogenic/Likely_pathogenic, drug_response
Mutation Classification:	Undefined	HGVSp: NP_005219.2
Is Artifact:	no	Sift: deleterious(0)
		PolyPhen: probably_damaging(1)
	NP_005219.2:p.Leu861Gln	
Gene:	EGFR	Location: chr7:55259524
Ref./ Mutation:	T / A (. PRESENT)	Depth: 8072
Allele Fraction:	0.577056	Clinical Sig. Pathogenic/Likely_pathogenic, drug_response
Mutation Classification:	Undefined	HGVSp: NP_005219.2
Is Artifact:	no	Sift: deleterious(0)
		PolyPhen: probably_damaging(0.983)

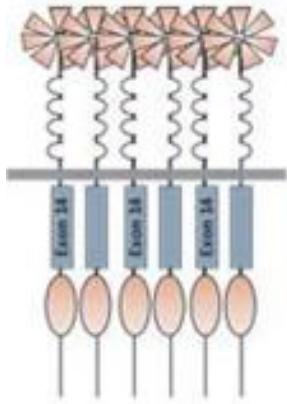


Détection des anomalies moléculaires de c-MET



Dérégulation de MET dans les cancers

Surexpression de MET

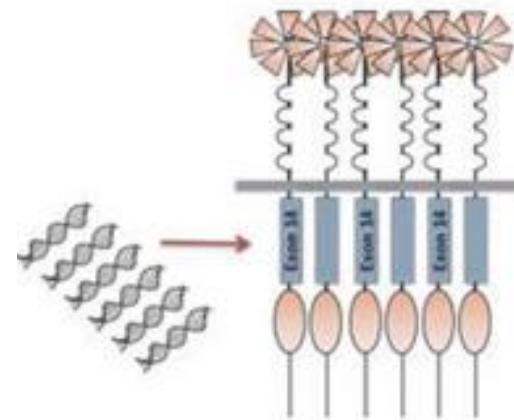


IHC



NGS

Amplification de MET



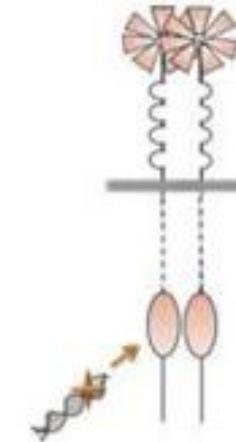
FISH

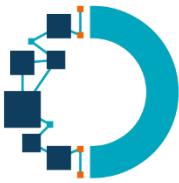
Mutations de MET

Domaine kinase Sites épissage exon 14



NGS

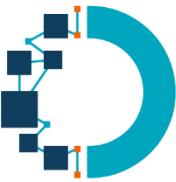




Surexpression de c-MET

- 25-39% de surexpression CBNPC
 - Faible corrélation
 - à l'amplification de c-MET (50% sensibilité- 83% spécificité)
 - aux mutations MET exon 14 (20% sensibilité – 83% spécificité)
- **4 anticorps disponibles**
 - SP44 (Ventana)
 - D1C2 (Cell Signaling Tech)
 - MET4 (Dako/Agilent)
 - *EP1454Y* (*Abcam*)
- **Principes du scoring IHC**
 - Quantification de l'expression de la protéine cible à la surface des cellules tumorales
 - Localisation attendue : **membranaire** (\pm cytoplasmique)
 - Intensité graduée (0 à 3+)
 - Proportion de cellules positives

Source : Hugues Bégueret



Etude de l'amplification de MET

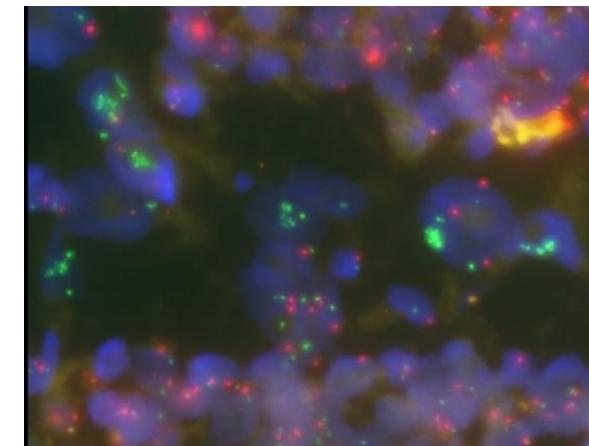
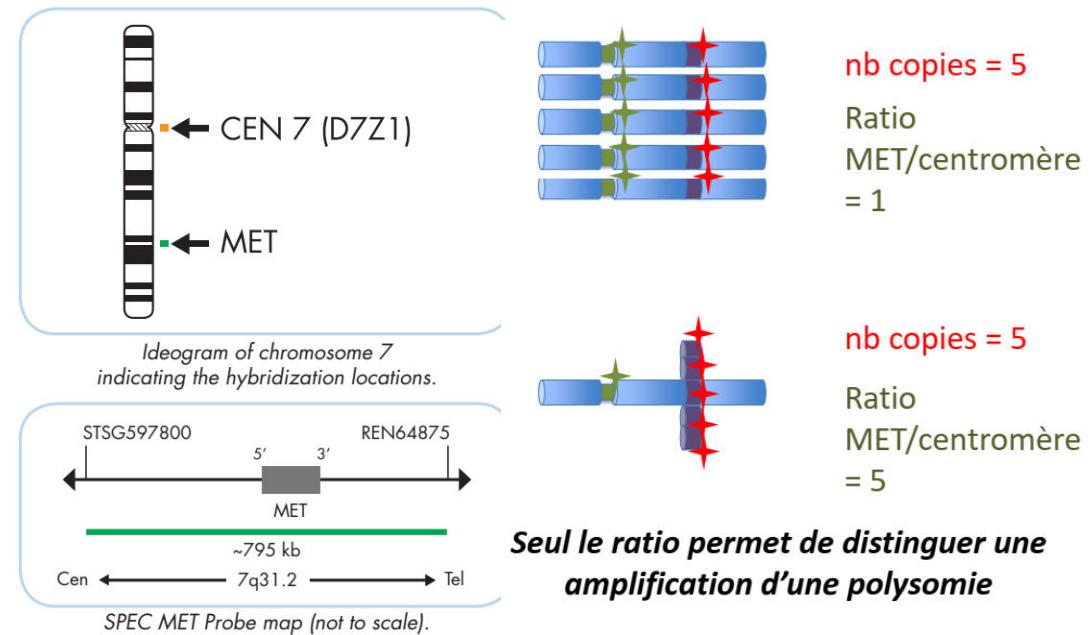
Comment rechercher une amplification ?

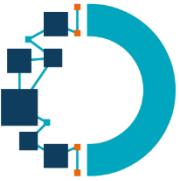
- **Par technique FISH**

- Gold standard
- Sur coupe FFPE 3µm
- Hybridation d'une 1^{ère} sonde sur le gène d'intérêt et d'une 2^{nde} sur le centromère, révélation par un fluorophore ou chromogène

- Deux façons de rendre les résultats :

- Nombre de copies du gène
- Ratio gène/centromère
- Pour MET :
 - Seuil de positivité : Nb de copies MET > 5 copies ou ratio MET/CEN7 > ou = 2 (Sequist et al, Lancet 2020)

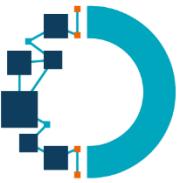




Etude de l'amplification de MET

Par technique NGS

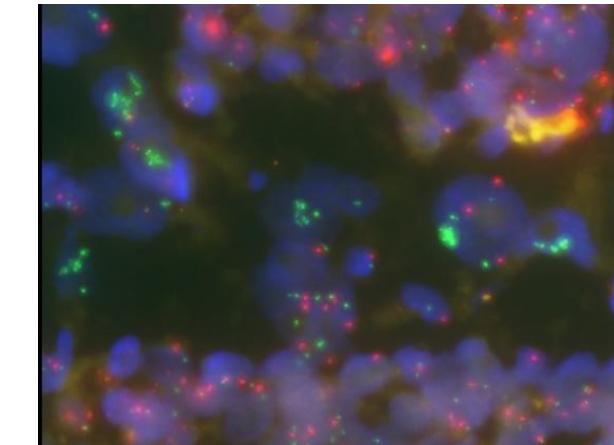
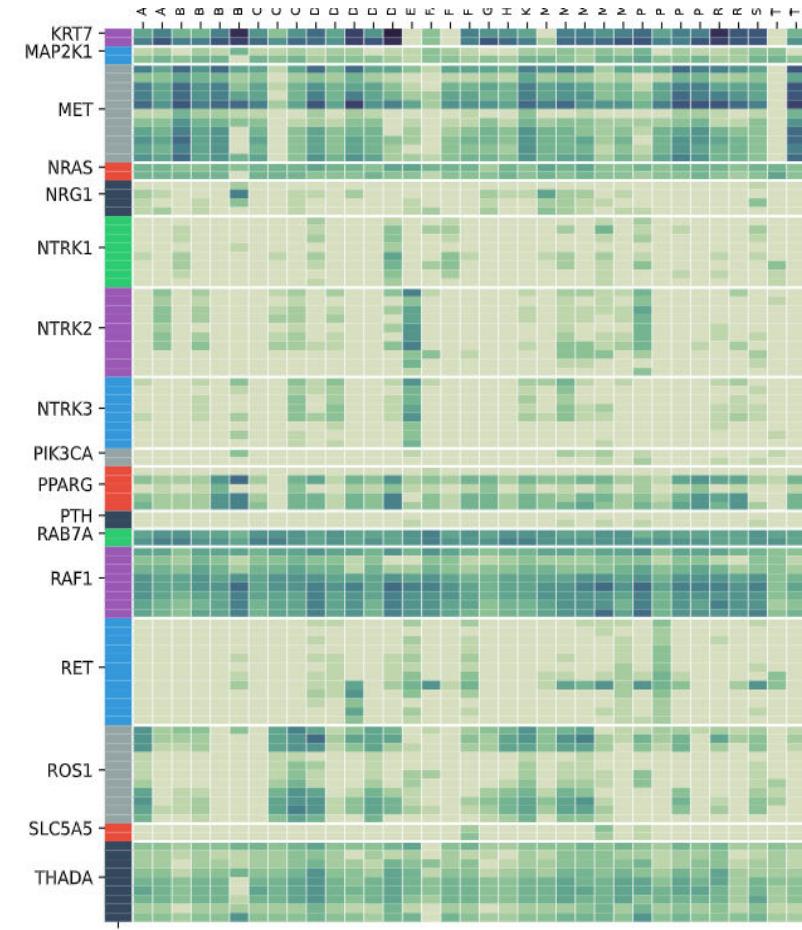
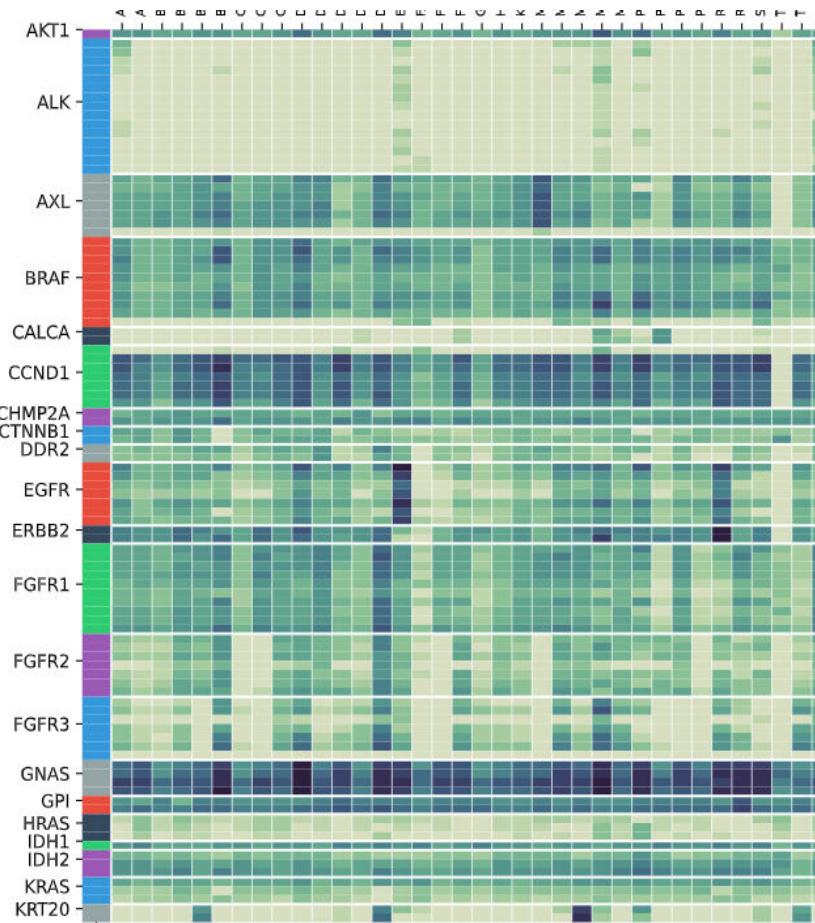
- Sur ADN
- Les principales difficultés sont :
 - Nombre de cibles limité (en targeted)
 - Profondeur de couverture hétérogène (en targeted)
 - Fraction tumorale inconnue, variable (estimation du Copy Number imprécise), non prise en compte par les outils bio-informatiques
 - Pas de contrôle ADN normal apparié (possibilité de faire des PON mais ça reste toujours moins bien)
- Par conséquent :
 - Seules les amplifications (> 10 copies) sont fiables



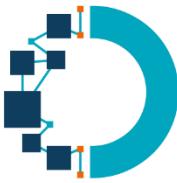
Etude de l'expression de MET

Par technique RNAseq ciblé Archer FusionPlex®

si détection d'une surexpression, nécessité de confirmer la présence d'une amplification par FISH



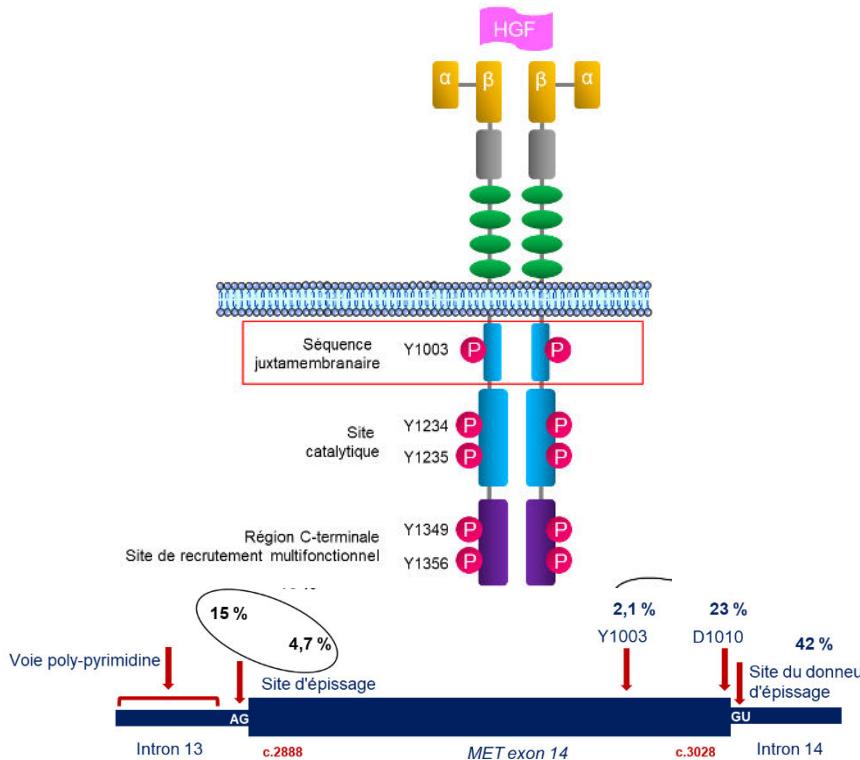
Zytolight® SPEC MET/CEN 7 Dual Color Probe



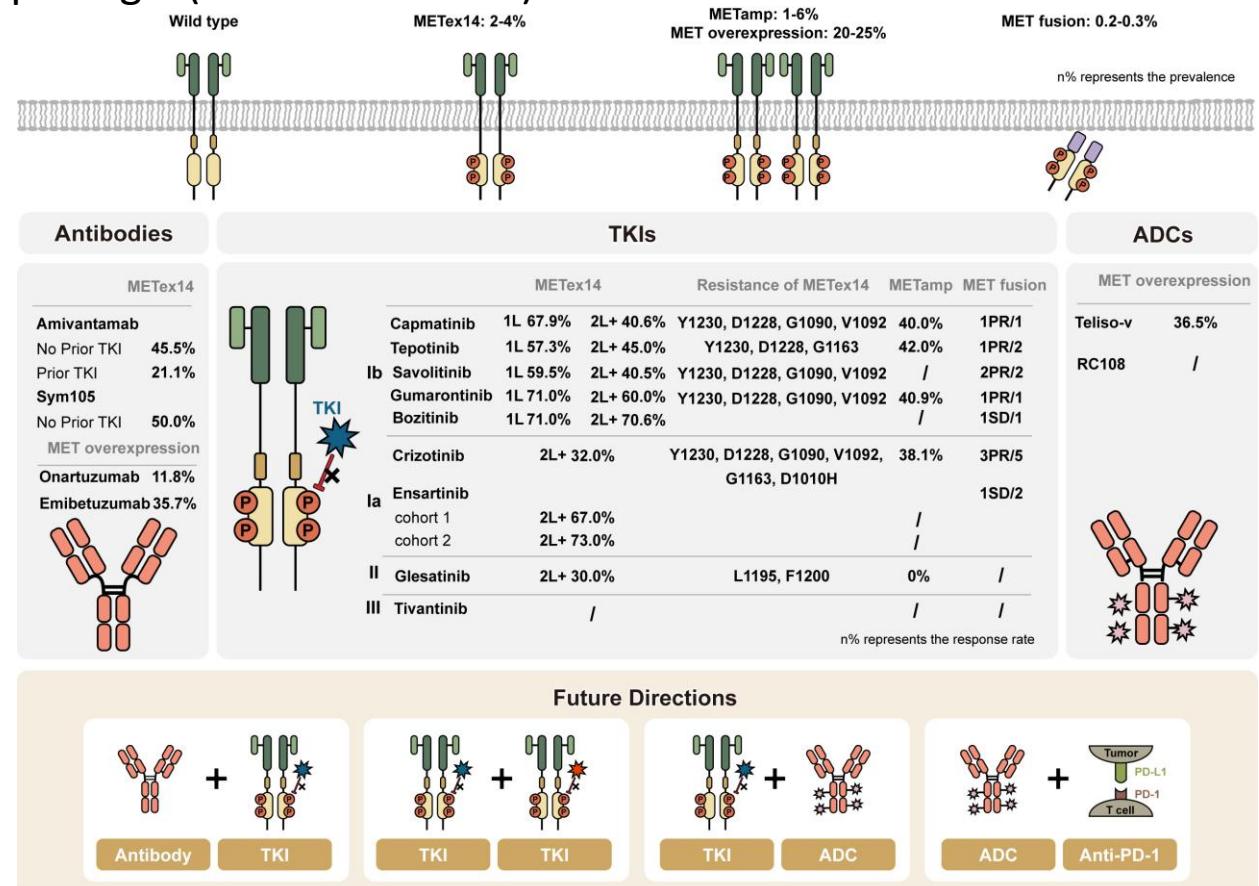
Détection des mutations de MET

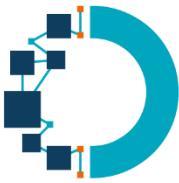
Par technique NGS

- Par technique NGS (ADN ciblé et/ou ARN ciblé)
- Mutations ponctuelles / mutations d'épissage (saut d'exon 14) : 2 à 4% des CBNPC



- ✓ Perte du domaine juxtamembranaire
- ✓ Codé par l'exon 14





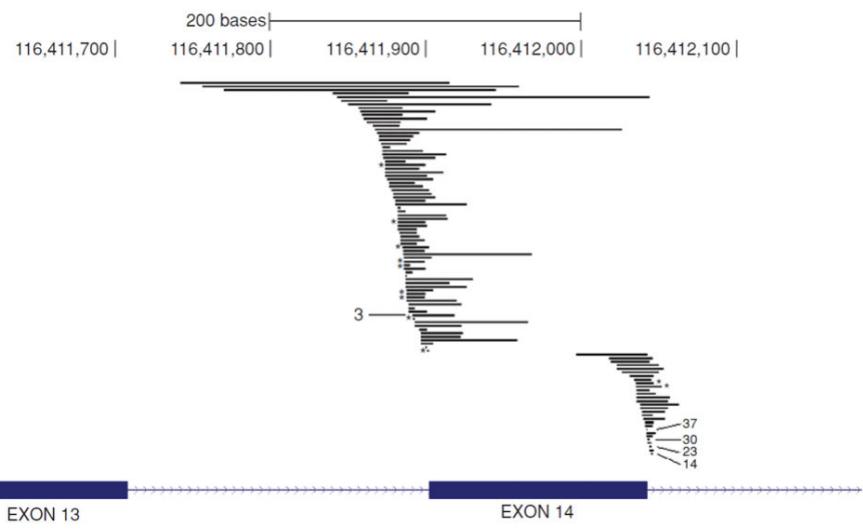
Détection des mutations d'épissage de MET

Avantages du RNAseq pour la détection du saut exon 14 de MET

Méthodes de détection

DNAseq:

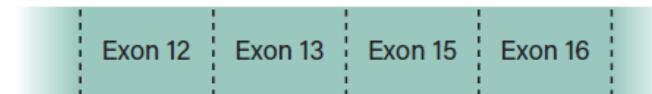
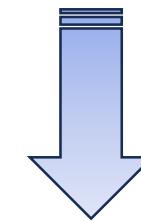
Analyse des mutations causales



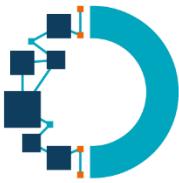
- ✓ Diversité de mécanismes
- ✓ Risque de faux négatif (longueur des introns)
- ✓ Variants introniques de signification indéterminée

RNAseq:

Analyse de la conséquence sur le transcrit



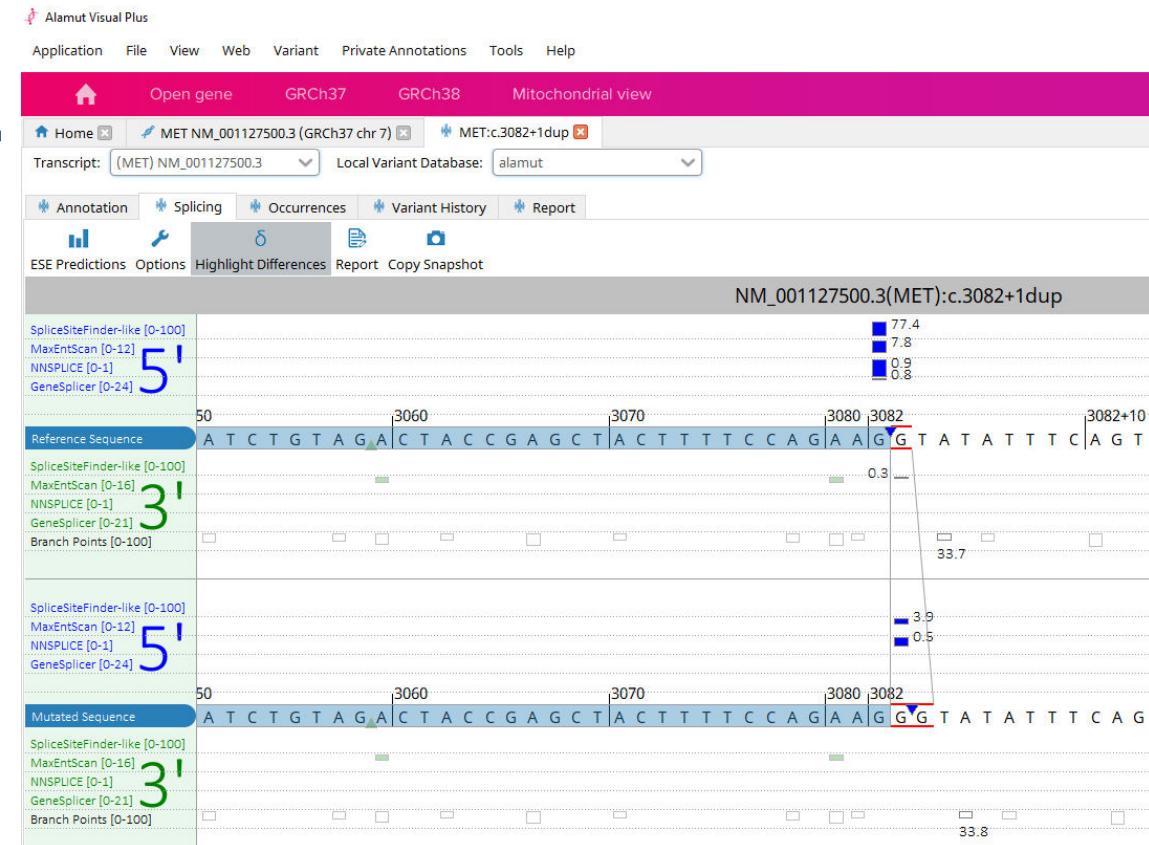
- ✓ Détection directe du saut d'exon



Mutation d'épissage MET

Cas pratique

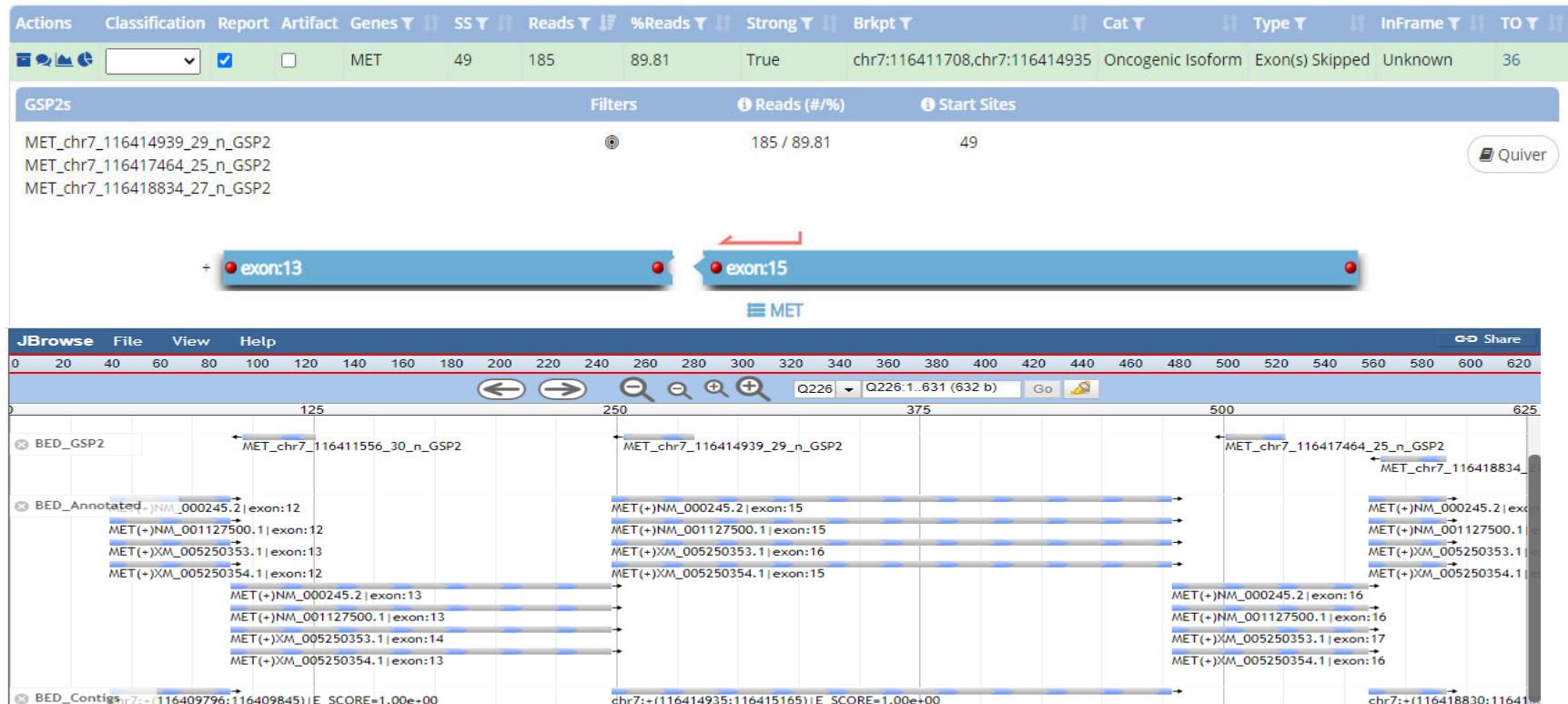
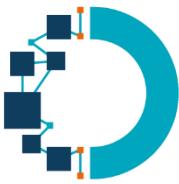
- Homme 79 ans
- Adénocarcinome LSG, tumeur cT3N0M0
- IHC ALK- et ROS1-
- PDL1 : 90% de cellules tumorales positives



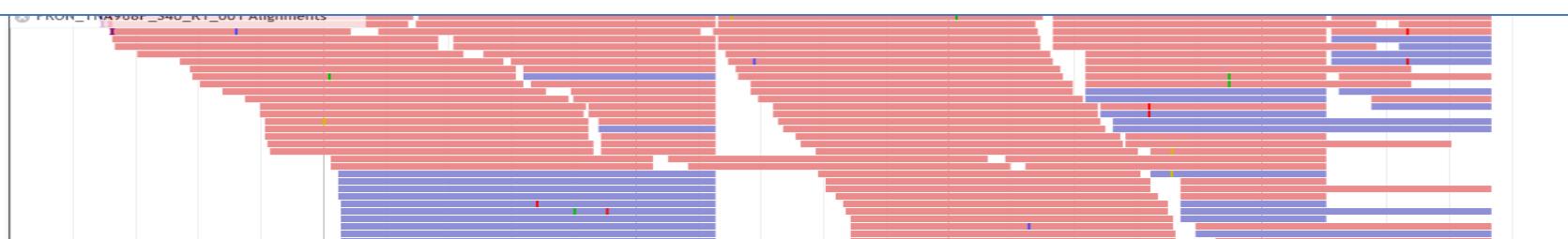
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	
1	Commentaire	Gene	Exon	Transcript	Chr	Position	Ref	Alt	c.	p.	c.p.f.	AVP1	AVP2	Region	Consequence	Sensitivity	Freq	Var.Cov.	Depth	Noise th.	ClinVar	InterVar	COSMIC
2		FGFR3	14	NM_001163213.2	chr4	1807894	G	A	c.1959G>A	p.(Thr653=)	c.1959G> variant	bam	exonic	synonymous			100	1795	1798	100,19	benign,likel	benign	COSV996001
3		PDGFRα	12	NM_006206.6	chr4	55141055	A	G	c.1701A>G	p.(Pro567=)	c.1701A> variant	bam	exonic	synonymous			100	3308	3313	100,32	benign,likel	benign	COSV999553
4	Faux positif corr	KIT	13	NM_00222.3	chr4	55594244	T	C	c.1947T>C	p.(Asn649=)	c.1947T> variant	bam	exonic	synonymous			12	383	3168	10,14	likely_benig	likely benign	
5		KIT		NM_00222.3	chr4	55599436	T	C	c.2484+78T>C	p.?	c.2484+7 variant	bam	intronic				51	1431	2781	190,44	benign		
6		EGFR	20	NM_005228.5	chr7	55249063	G	A	c.2361G>A	p.(Gln787=)	c.2361G> variant	bam	exonic	synonymous			53	3629	6819	141,33	benign,likel	benign	COSV517694
7	Warning : Annov MET		14	NM_001127500.3	chr7	116412043	-	G	c.3082_3082+1insG	p.?	c.3082_3 variant	bam	exonic	frameshift			35	1223	3517	0,23			
8		MET		NM_001127500.3	chr7	116435768	C	T	c.3912C>T	p.(Asp1304=)	c.3912C> variant	bam	exonic	synonymous			100	5028	5040	99,83	benign	benign	COSV592559

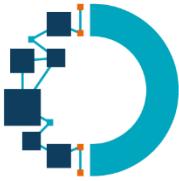


Mise en évidence de la **mutation c.3082+1dup; p.?** dans l'**exon 14 du gène MET**. Mutation prédictée in silico selon certains outils de prédiction, comme ayant potentiellement un retentissement sur l'épissage, ce variant pourrait être sensible à certains inhibiteurs de l'activité kinase de MET. Une analyse complémentaire par technique NGS Archer est en cours et fera l'objet d'un compte-rendu complémentaire.



Mise en évidence d'un épissage abnormal entraînant un saut de l'exon 14 du gène **MET** (isoforme de référence **NM_000245**), confirmant l'impact sur l'épissage de la mutation c.3082+1dup au niveau du site donneur d'épissage au début de l'intron 14 du gène **MET**, mutation mise en évidence sur l'ADN génomique tumoral. Altération susceptible de répondre aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur **MET**.





En pratique au CHU de Bordeaux

Testing moléculaire CBNPC

Biopsie/PO/EBUS/liquide pleuro-péricardique

Tous stades

Au diagnostic et/ou à la rechute

Laboratoire de pathologie

IHC ALK
PDL1

sur demande :
IHC MET, ROS1...

Laboratoire de biologie moléculaire - SBT

NGS RNAseq ciblé (Archer FusionPlex®)

Mutations

Fusions

Surexpression/
amplification
(IHC et FISH)

