



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

21 Novembre 2025

Angoulême

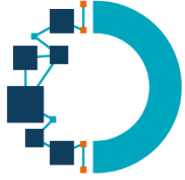
Emilie TOULZA

Pharmacien – Institut Bergonié

Charline CAUMONT

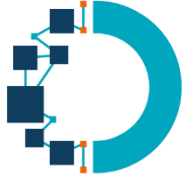
Biologiste – CHU Bordeaux

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



Liens d'intérêts

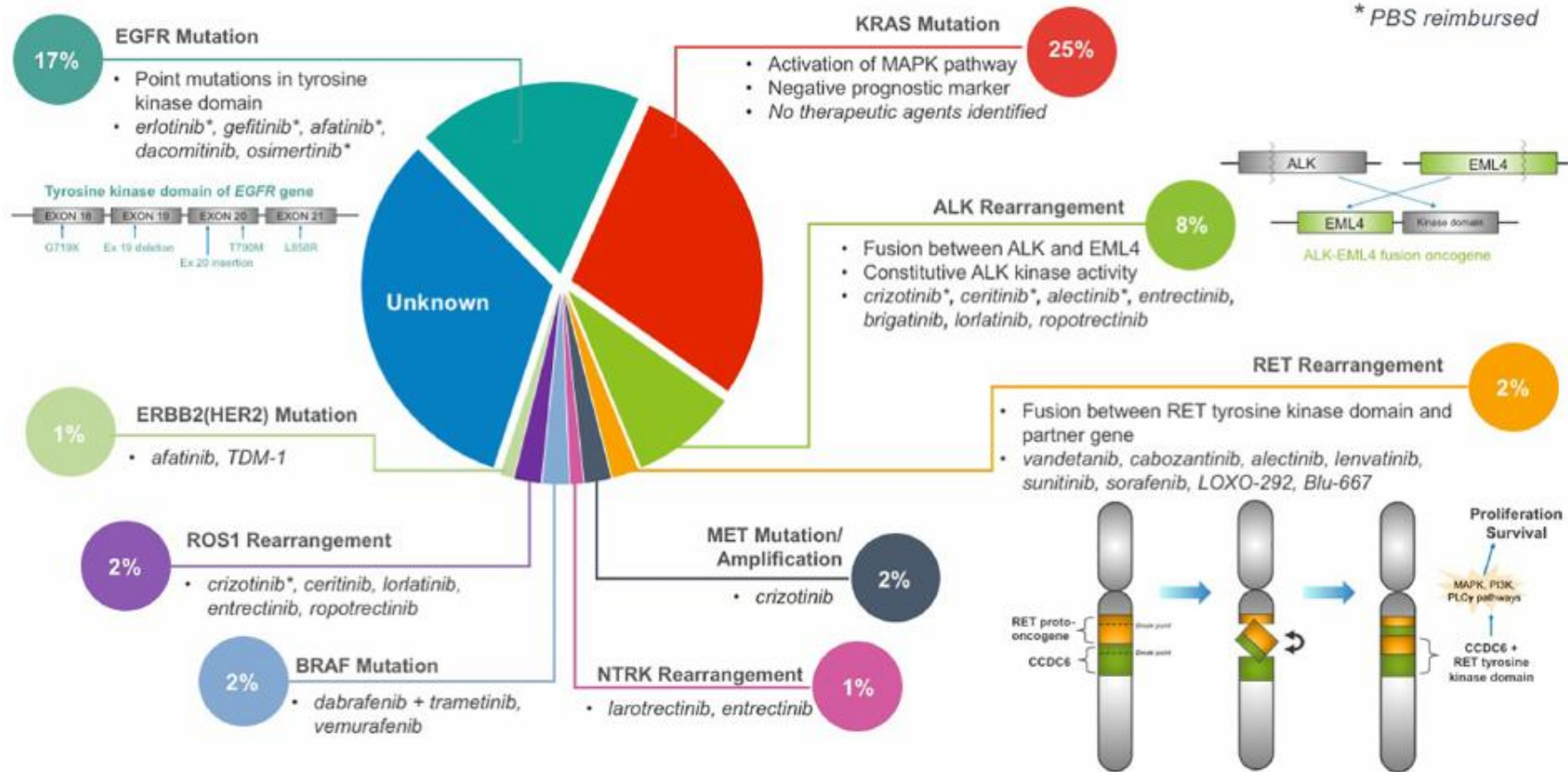
- Astrazeneca
- Pfizer
- Roche
- Boehringer-Ingelheim
- MSD

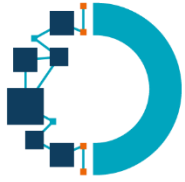


CBNPC

Quelles anomalies moléculaires ?

Common Genomic Alterations in Lung Adenocarcinoma





Accès précoces

Oncologie thoracique

CBPNC

Stade localement
avancé/non résécable

Stade métastatique

Osimertinib

Amivantamab

Telisotuzumab
Vedotin

EGFR
Del19 / L858

EGFR
Ins20 1L
Del19/L858R après
échec ITK 3G

MET
Surexpression
Amplification
EGFR WT

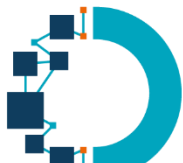
CBPC

Stade limité

Durvalumab



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

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



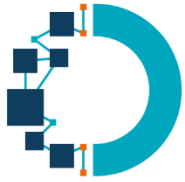
- Technique ciblée COBAS®: recherche de certaines mutations EGFR
- >10% cellules tumorales

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)





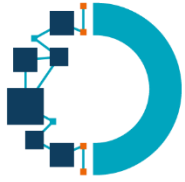
Techniques à privilégier selon les anomalies moléculaires à rechercher

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

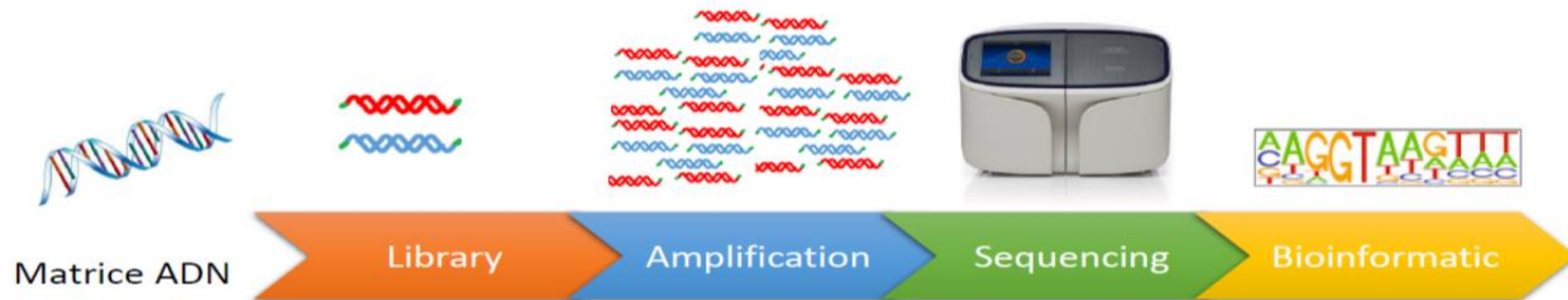
PATIENTS ATTEINTS D'UN CANCER BRONCHIQUE NON À PETITES CELLULES

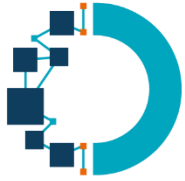
/ Indications des tests moléculaires
en vue de la prescription
de traitements de précision



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®

AKT1	CTNNB1	FGFR3	KRT7	NTRK1	RAF1
ALK	DDR2	GNAS	KRT20	NTRK2	RET
AXL	EGFR	HRAS	MAP2K1	NTRK3	ROS1
BRAF	ERBB2	IDH1	MET	PIK3CA	SLC5A5
CALCA	FGFR1	IDH2	NRAS	PPARG	THADA
CCND1	FGFR2	KRAS	NRG1	PTH	TTF1

J1

Sélection zone
tumorale
Extraction TNA

J2

Préparation
librairie

J3

Dosage
/Quantification
de la librairie
Séquençage

J4

Analyse
bioinformatique

J5

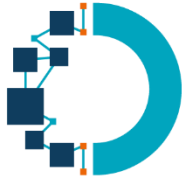
Interprétation /
Validation
biologique

- 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

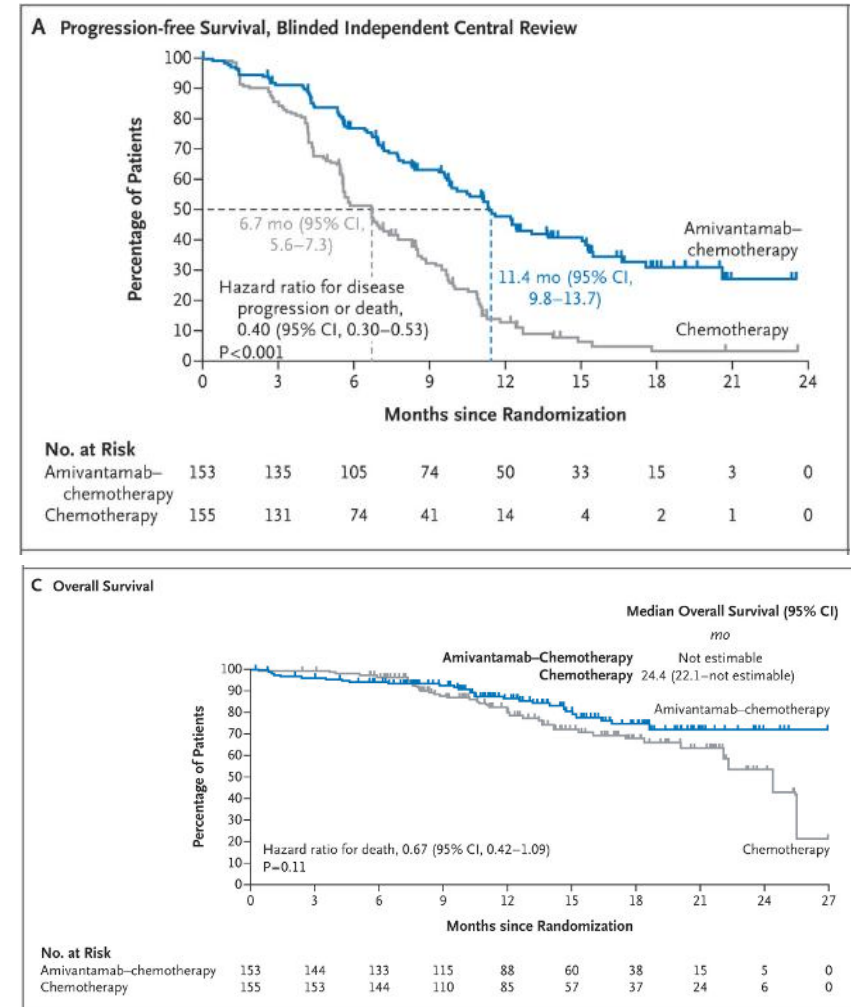
Programmation technique BM -> diffusion résultat:
12 à 15 jours ouvrés (2 semaines)

Partie dry-lab

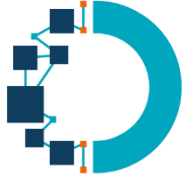


Focus: Insertions en phase dans l'exon 20 d'EGFR

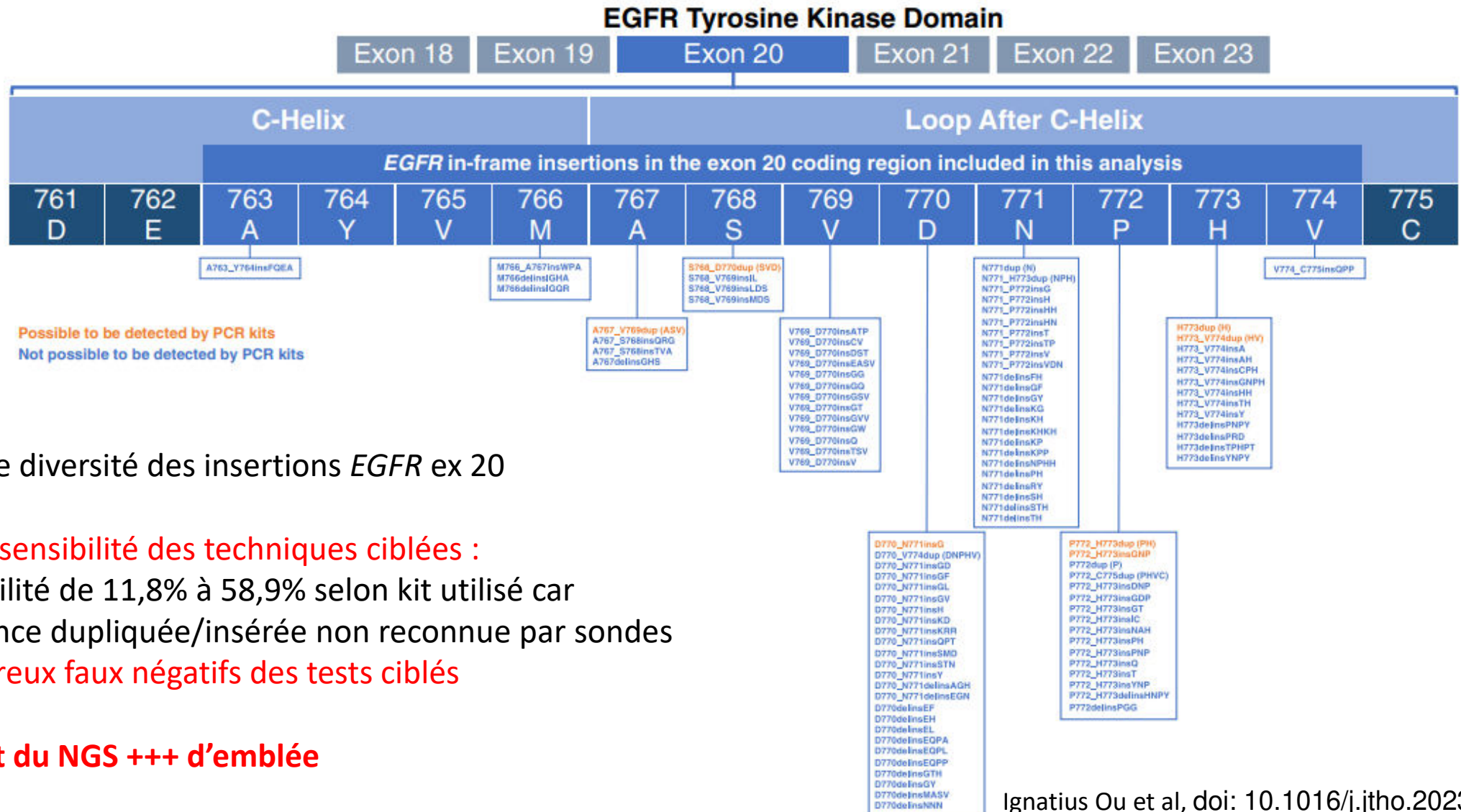
- 5-10% des mutations *EGFR* dans les CBNPC.
- Mécanisme d'activation sans changement d'affinité à l'ATP (faiblesse des TKI classiques)
- **Alternative: Amivantamab (anticorps bi-spécifique anti EGFR/MET)**
- ✓ Données de phase III (étude PAPILLON) en 1L:
- ✓ Bénéfice en PFS et OS de la Combinaison amivantamab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



Zhou et al, NEJM 2023, doi: 10.1056/NEJMoa2306441.

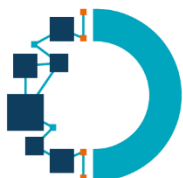


Focus: Insertions en phase dans l'exon 20 d'EGFR



- 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.jtho.2023.01.086.



Mutation EGFR exon 20

En pratique

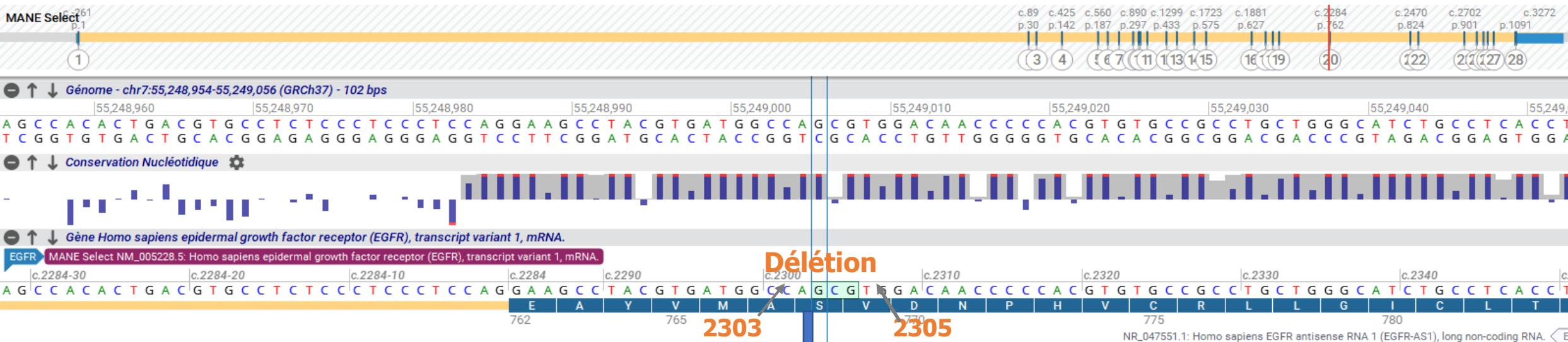
Vue générale du transcrit NM_005228.5 (EGFR)

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

gnomAD SCORES

OMIM®

BRIDGES



Déletion

2303 **2305**

Codons wt
Codons mutés

AGC GTG
ATC TTG

768 769

Acides aminés wt
Acides aminés mutés

Ser Val
Ile Leu

Substitution TCT

Acides aminés substitués

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

c.2303_2305delinsTCT; p.(Ser768_Val769delinsIleLeu)



En pratique

Vue générale du transcrit NM_005228.5 (EGFR)

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

gnomAD SCORES

OMIM®



2302 2305

Substitution CCGC

Codons wt
Codons mutés

AGC GTG
CCG CTG

768 | 769

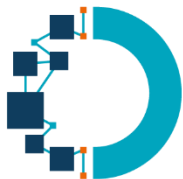
Acides aminés substitués

Acides aminés wt
Acides aminés mutés

Ser Val
Pro Leu

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

c.2302_2305delinsCCGC ; p.Ser768_Val769delinsProLeu



Mutation EGFR exon 20

En pratique

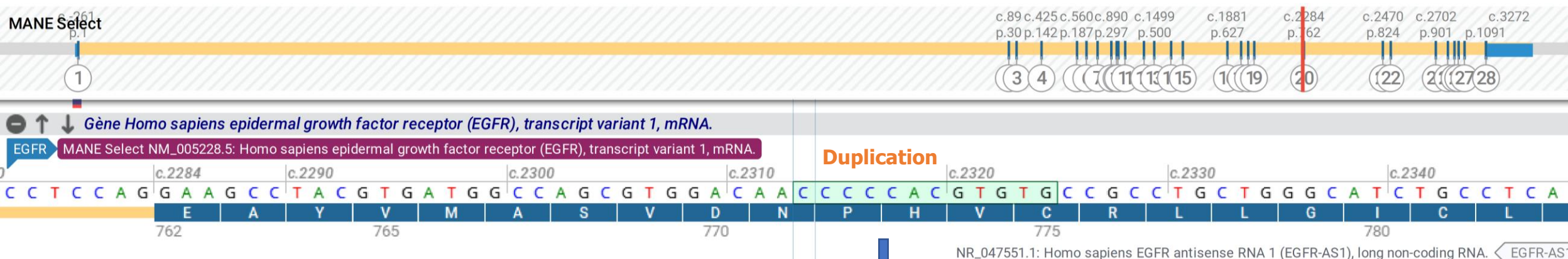
Vue générale du transcrit NM_005228.5 (EGFR)

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

gnomAD SCORES

OMIM®

BI



Duplication

2313

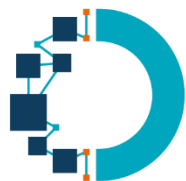
2324

Insertion (duplication) de
12 paires de bases

Insertion (duplication) de
4 acides aminés

c.2313_2324dup ; p.Tyr772_Ala775dup

Mutation à considérer
comme duplication/insertion
EGFR exon 20



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.Gly719Ala / p.Gly719Cys ; p.Gly719Cys(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



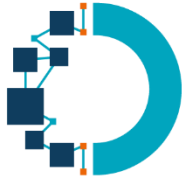
BIOCARTIS

RAPPORT DES RÉSULTATS DU TEST

Test réalisé en fonction des procédures Biocartis et/ou de la réglementation en vigueur. Les résultats sont fournis sous réserve de la validation des procédures de contrôle qualité.



L858R	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
SUPPRESSION DE L'EXON 19	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
T790M	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
S768I	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
CQ 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

Ref./ Mutation: G / T (. PRESENT)

Allele Fraction: 0.539983

Mutation Classification: Undefined

Is Artifact: no

Location: chr7:55241707

Depth: 8291

Clinical Sig. Pathogenic/Likely_pathogenic,_drug_response

HGVSp: NP_005219.2

Sift: deleterious(0)

PolyPhen: probably_damaging(1)

NP_005219.2:p.Leu861Gln

Gene: EGFR

Ref./ Mutation: T / A (. PRESENT)

Allele Fraction: 0.577056

Mutation Classification: Undefined

Is Artifact: no

Location: chr7:55259524

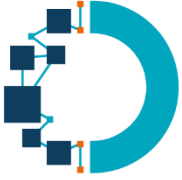
Depth: 8072

Clinical Sig. Pathogenic/Likely_pathogenic,_drug_response

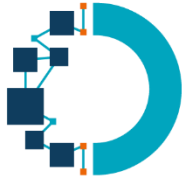
HGVSp: NP_005219.2

Sift: deleterious(0)

PolyPhen: probably_damaging(0.983)

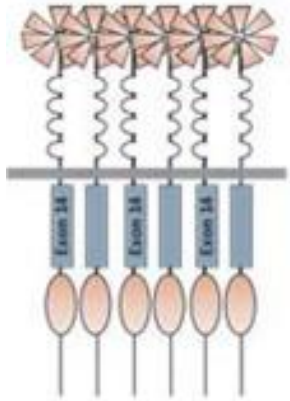


Détection des anomalies moléculaires de c-MET

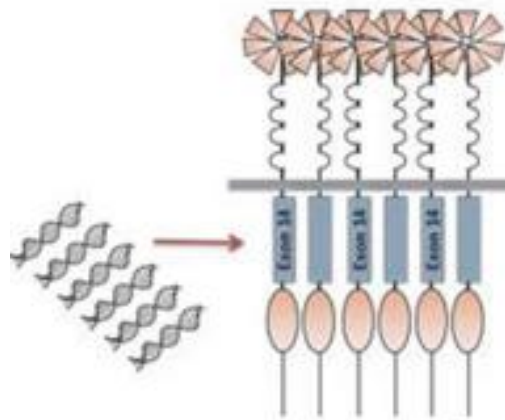


Dérégulation de MET dans les cancers

Surexpression de MET



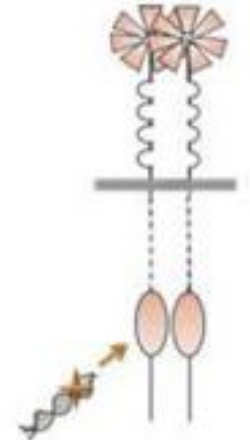
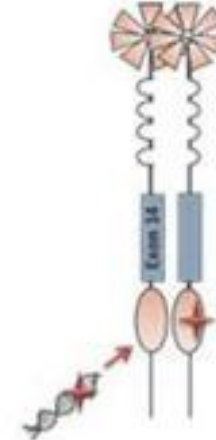
Amplification de MET



Mutations de MET

Domaine kinase

Sites épissage exon 14

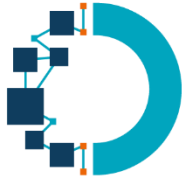




Surexpression de c-MET

- 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** (± cytoplasmique)
 - Intensité graduée (0 à 3+)
 - Proportion de cellules positives

Source : Hugues Bégueret



Etude de l'amplification de MET

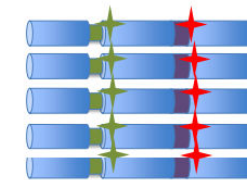
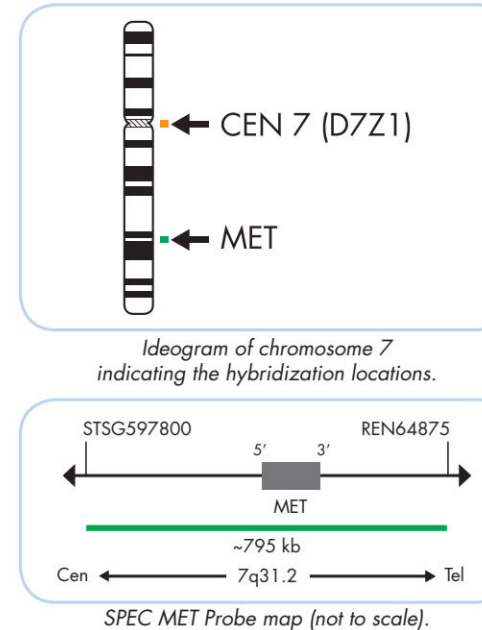
Comment rechercher une amplification ?

■ Par technique FISH

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

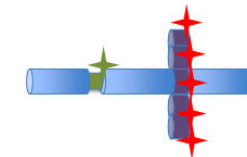
■ Deux façons de rendre les résultats :

- 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)



nb copies = 5

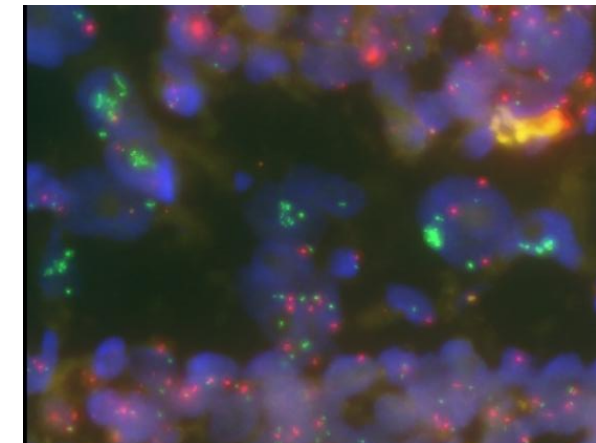
Ratio
MET/centromère
= 1



nb copies = 5

Ratio
MET/centromère
= 5

Seul le ratio permet de distinguer une amplification d'une polysomie

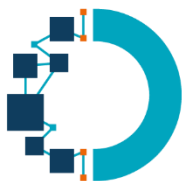




Etude de l'amplification de MET

Par technique NGS

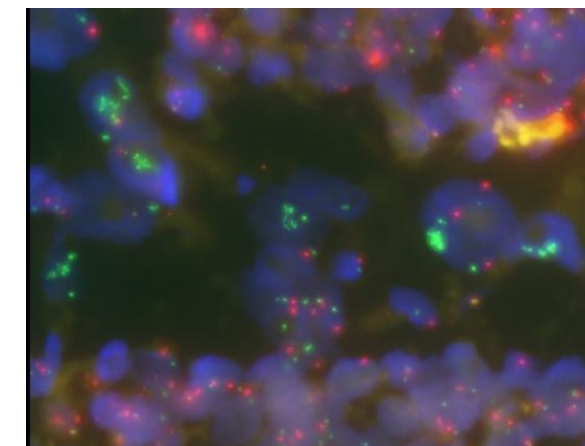
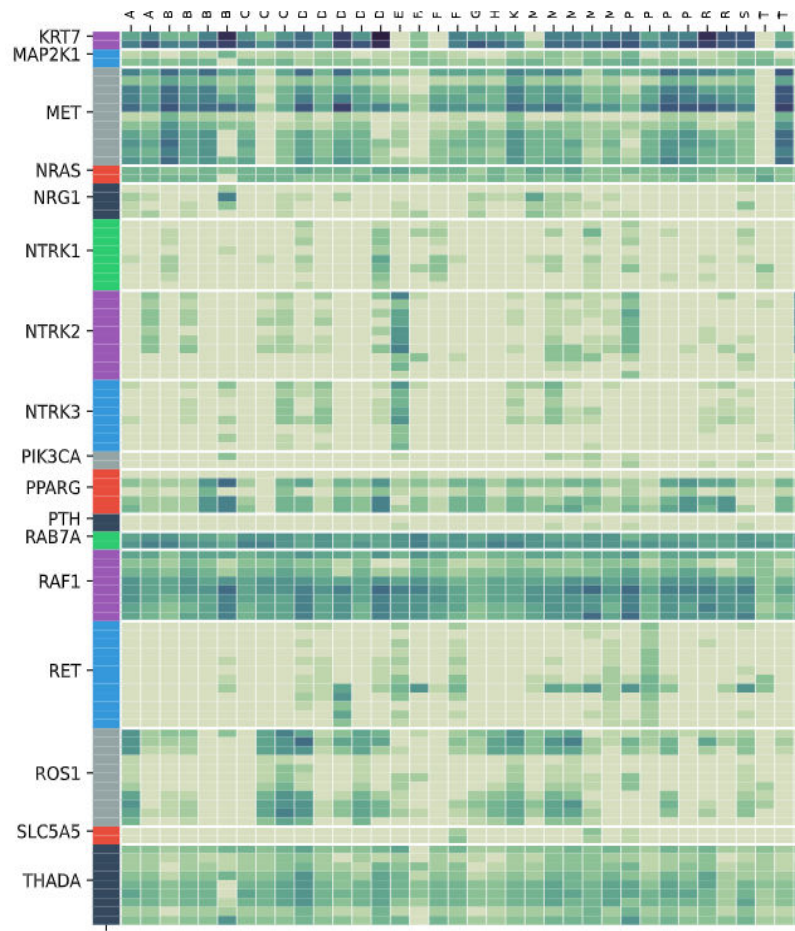
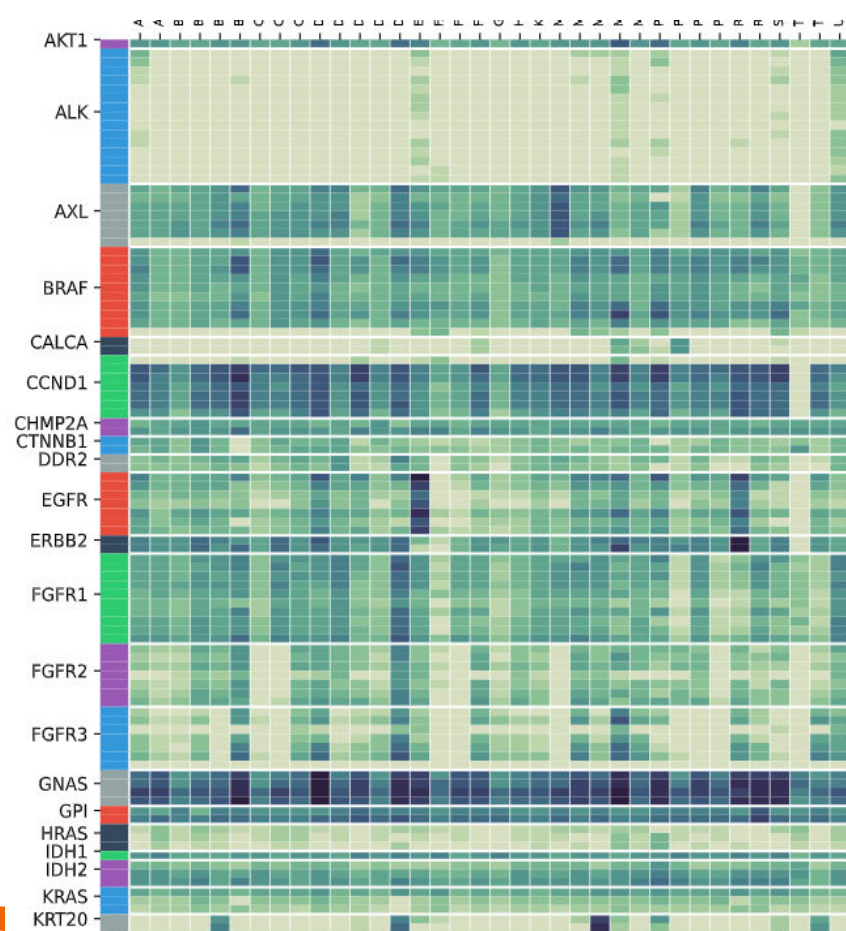
- Sur ADN
- Les principales difficultés sont :
 - Nombre de cibles limité (en targeted)
 - Profondeur de couverture hétérogène (en targeted)
 - Fraction tumorale inconnue, variable (estimation du Copy Number imprécise), non prise en compte par les outils bio-informatiques
 - Pas de contrôle ADN normal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



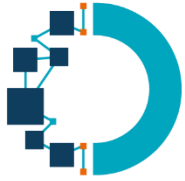
Etude de l'expression de MET

Par technique RNAseq ciblé Archer FusionPlex®

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



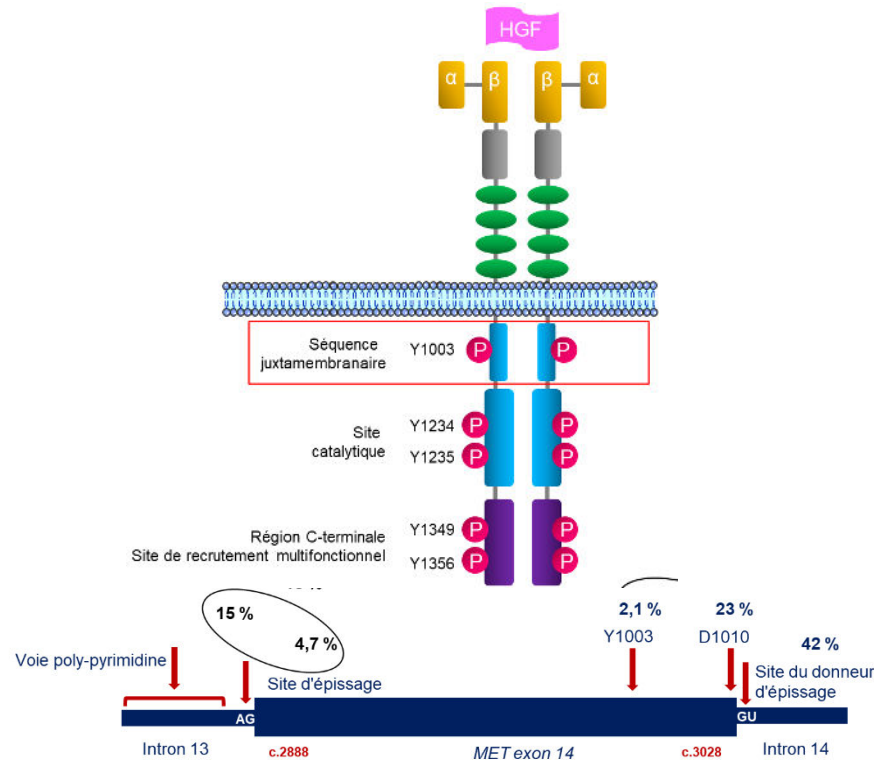
ZytoLight® SPEC MET/CEN 7 Dual Color Probe



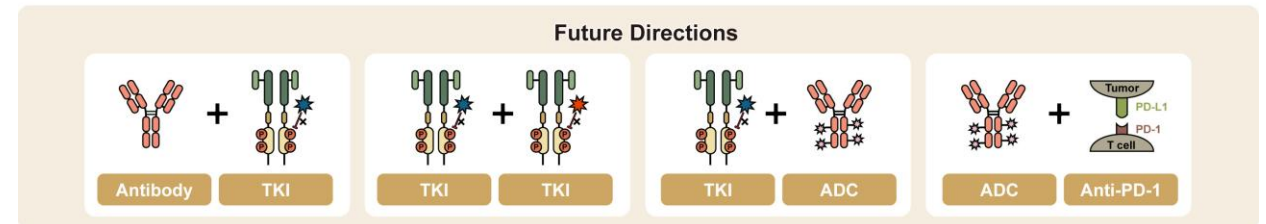
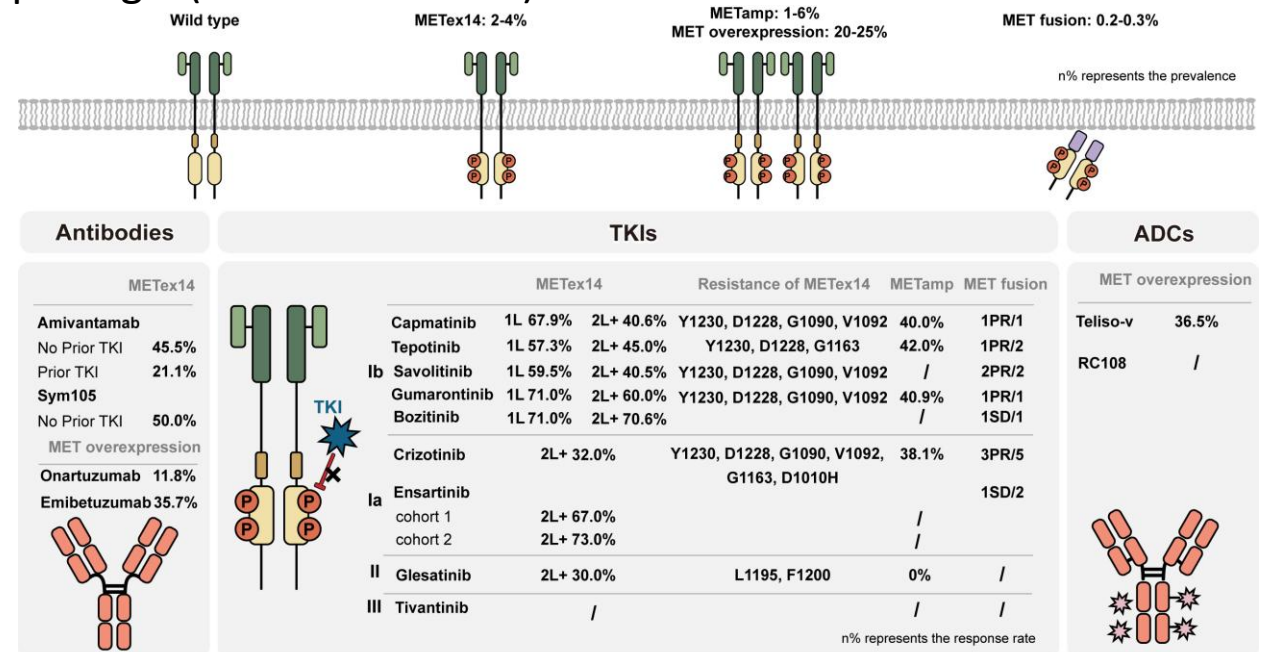
Détection des mutations de MET

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





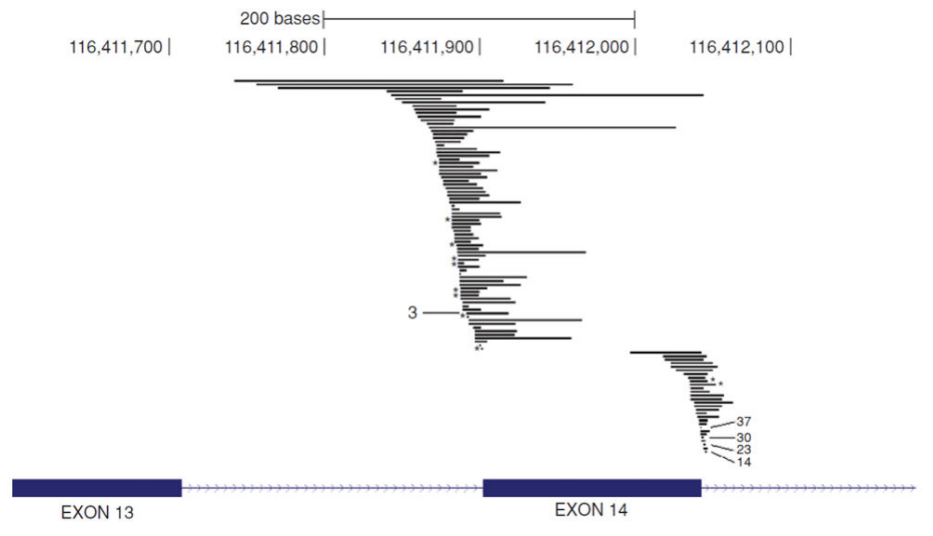
Détection des mutations d'épissage de MET

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

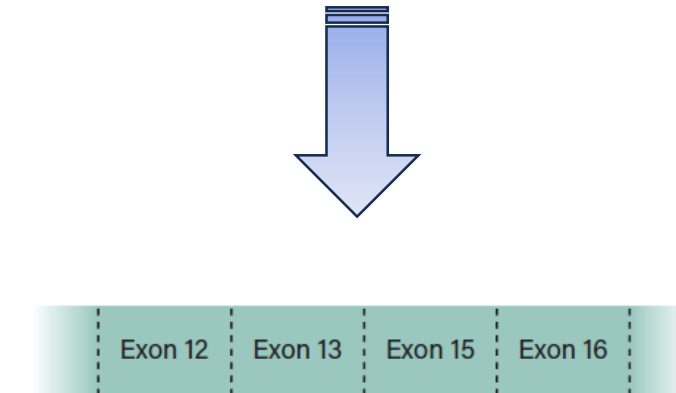
Méthodes de détection

DNAseq:
Analyse des mutations causales

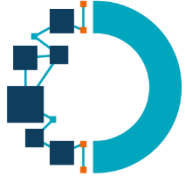
RNAseq:
Analyse de la conséquence sur le transcrit



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



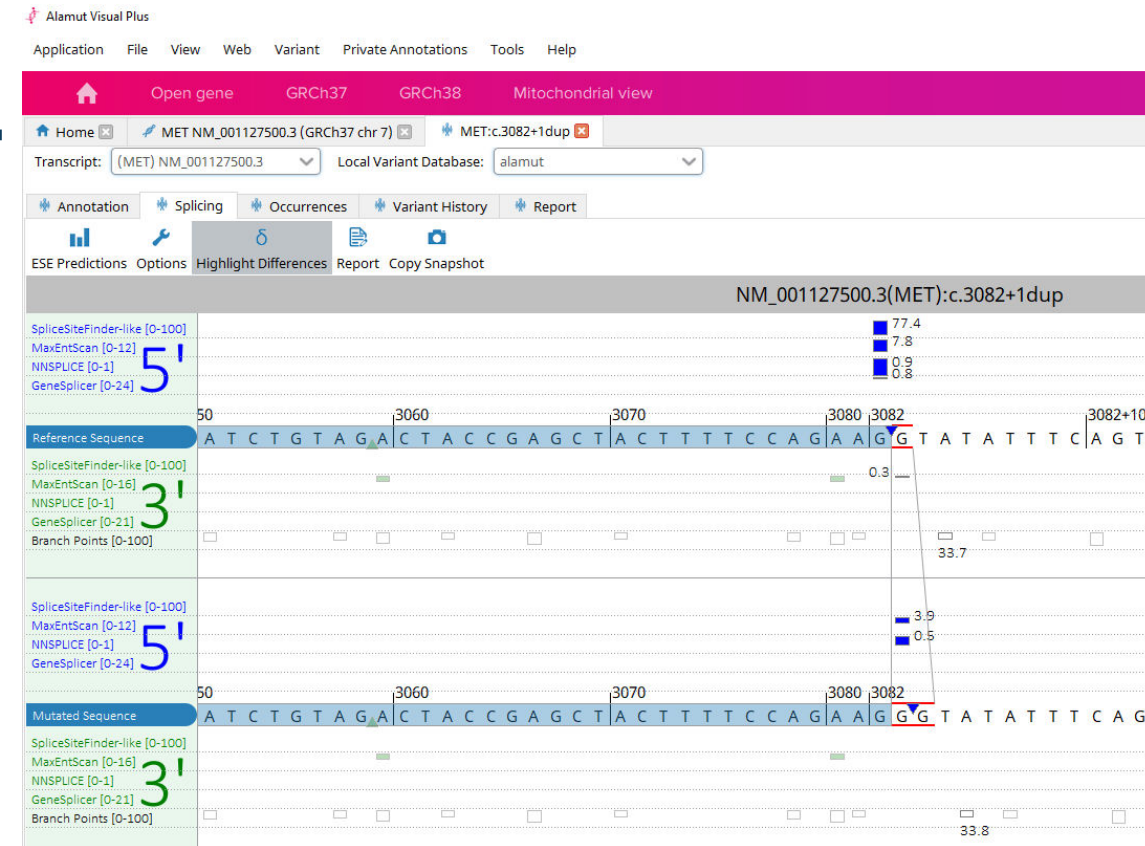
✓ Détection directe du saut d'exon



Mutation d'épissage MET

Cas pratique

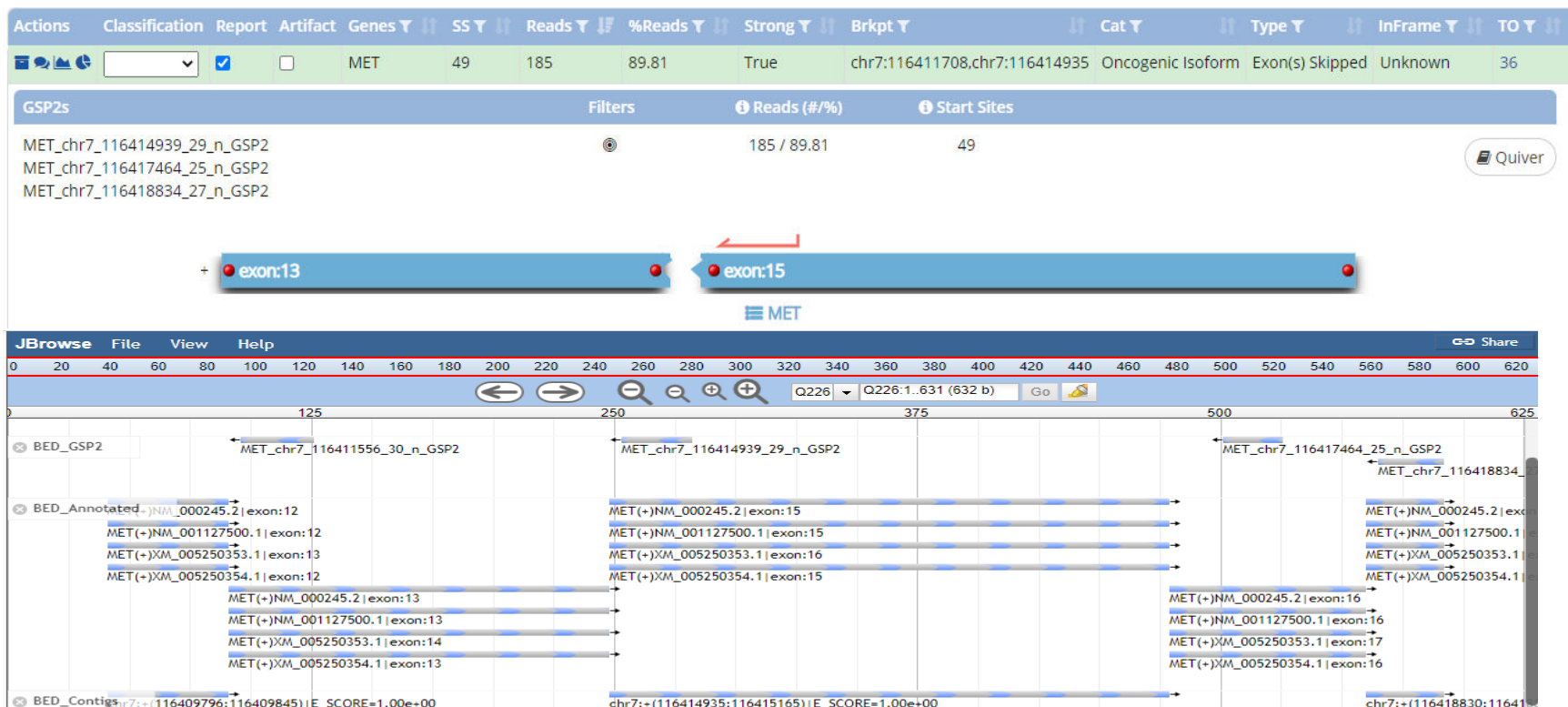
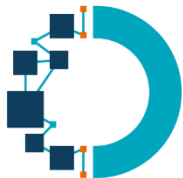
- Homme 79 ans
- Adénocarcinome LSG, tumeur cT3N0M0
- IHC ALK- et ROS1-
- PDL1 : 90% de cellules tumorales positives



	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,likely	benign	COSV996001
3		PDGFRA	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,likely	benign	COSV999553
4	Faux positif conr	KIT	13	NM_000222.3	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_000222.3	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,likely	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	20	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

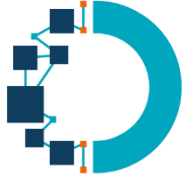


Mise en évidence de la **mutation c.3082+1dup; p.?** dans l'exon 14 du gène **MET**. Mutation prédite in silico selon certains outils de prédiction, comme ayant potentiellement un retentissement sur l'épissage, ce variant pourrait être sensible à certains inhibiteurs de l'activité kinase de MET. Une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



Mise en évidence d'un épissage anormal entrainant 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)

