



Plateforme **HUVEGEN**

GENOTYPAGE de la Résistance et de la Sensibilité aux Traitements Des Tumeurs Solides

Dr. Etienne Rouleau

Praticien spécialiste des CLCC

Laboratoire d'Oncogénétique

Diagnostic Constitutionnel et Somatique

Institut Curie - Hôpital René Huguenin

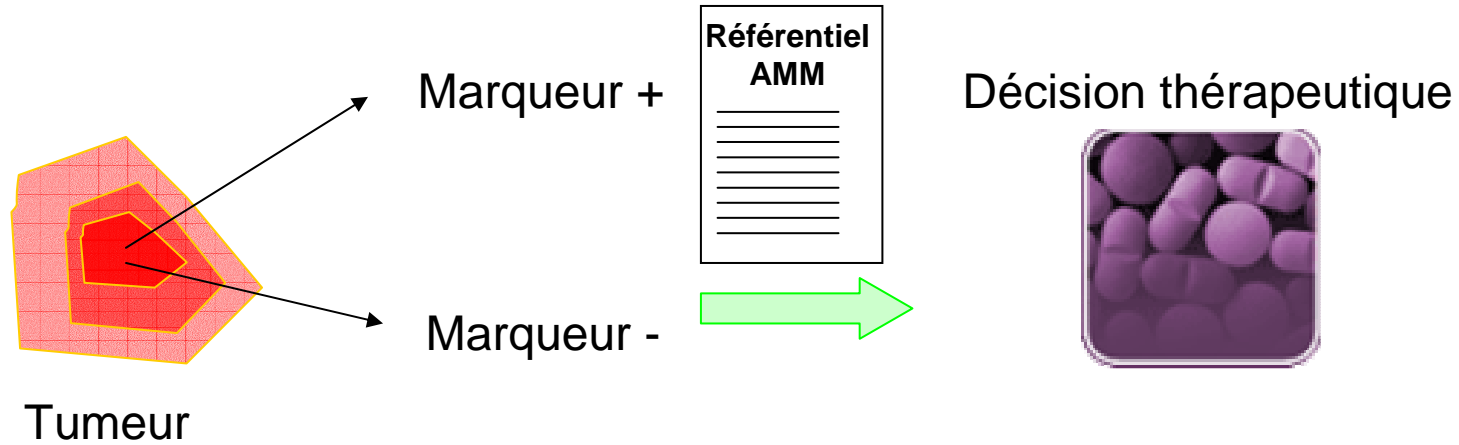
35, rue Dailly

92210 ST CLOUD





“Thérapeutique ciblée”



Nom	Nom Commercial	Molécule	Cible	Indications
Cetuximab	Erbix®	Ac	REGF	Colon (KRas WT)
Panitumumab	Vectibix®	Ac	REGF	Colon (KRas WT)
Bevacizumab*	Avastin®	Ac	VEGF	Colon, Poumon, Sein
Trastuzumab	Herceptin®	Ac	ERBB2	Sein
Erlotinib	Tarceva®	PMI	REGF	Poumon, Pancréas
Gefitinib	Iressa®	PMI	REGF	Poumon (REGF Muté?)
Lapatinib	Tyverb®	PMI	REGF + ERBB2	Sein, Cerveau
Imatinib	Glivec®	PMI	PDGFR, KIT, BCR-ABL	LMC, GIST
Dasatinib	Sprycel®	PMI	PDGFR, KIT	LMC, GIST, Res Glivec
Nilotinib	Tasigna®	PMI	PDGFR, KIT	LMC, GIST, Res Glivec
Sunitinib*	Sutent®	PMI	MultiTKR	GIST Res Glivec, Rein
Vandetanib	Zactima®	PMI	MultiTKR	Poumon
Sorafenib*	Nexavar®	PMI	MultiTKR (+BRAF)	Rein
Bortezomib	Velcade®	PMI	Ptotéasome, NFKB	Poumon, Prost, Myélo
CCI-779	-	PMI	mTOR	Essais cliniques
Zarnestra	-	PMI	Ras (FPT)	Essais cliniques



Tumeurs solides

BIO-PATHOLOGIE

- Hétérogénéité
- Complexité des altérations génétiques
- Stratégies d'analyse
 - Etude de l'amplification / de l'expression
 - Etude d'une ou plusieurs mutations / pas d'outils pour l'expression

ORGANISATION

- Fréquence des maladies
 - Absence de réseau spécifique
 - Multiplicité d'intervenants
- Pluridisciplinarité : anatomopathologie – génétique
- Nature des prélèvements

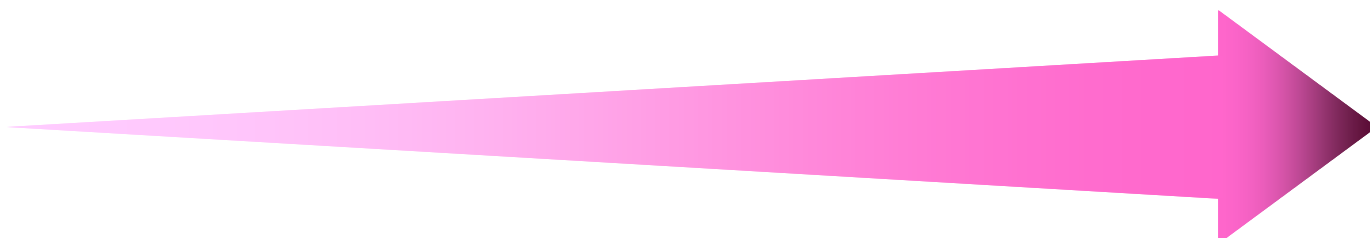
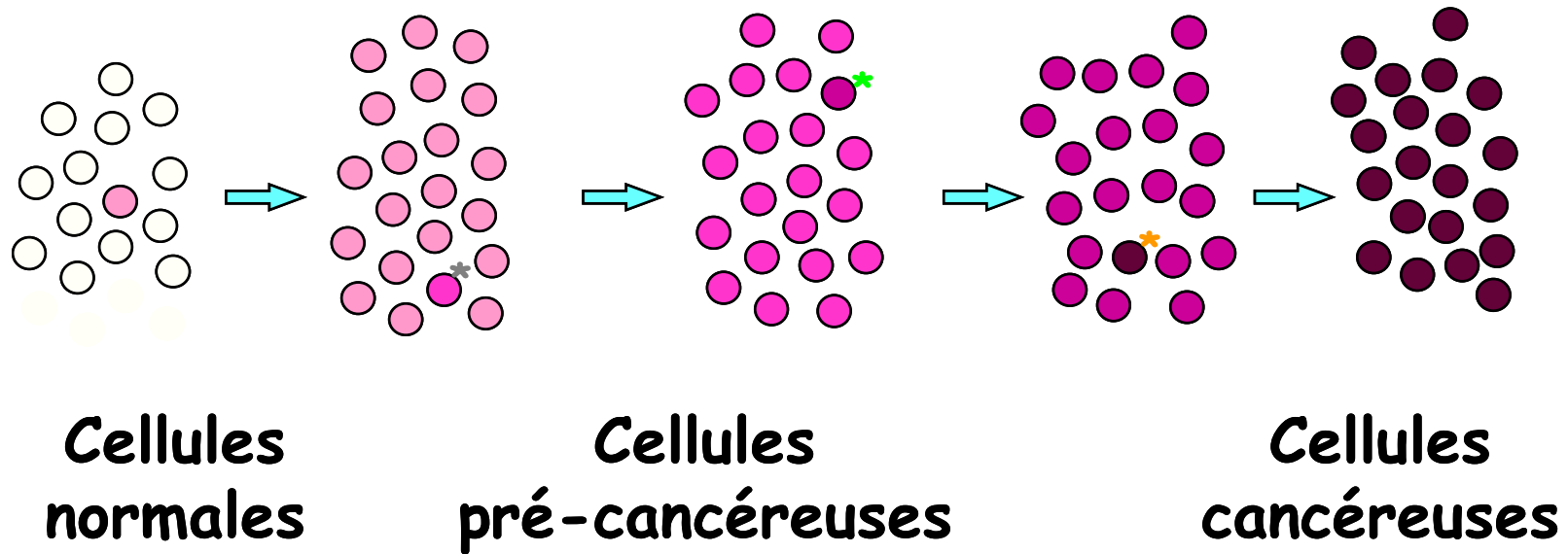


BIO-PATHOLOGIE



BIO-PATHOLOGIE

Hétérogénéité tissulaire



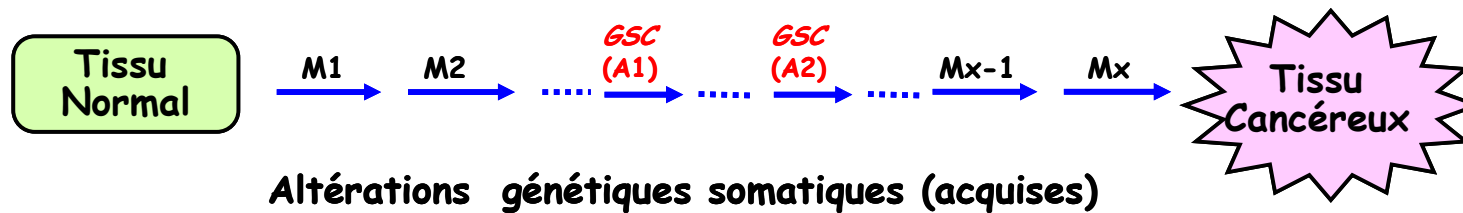
Processus de cancérogénèse



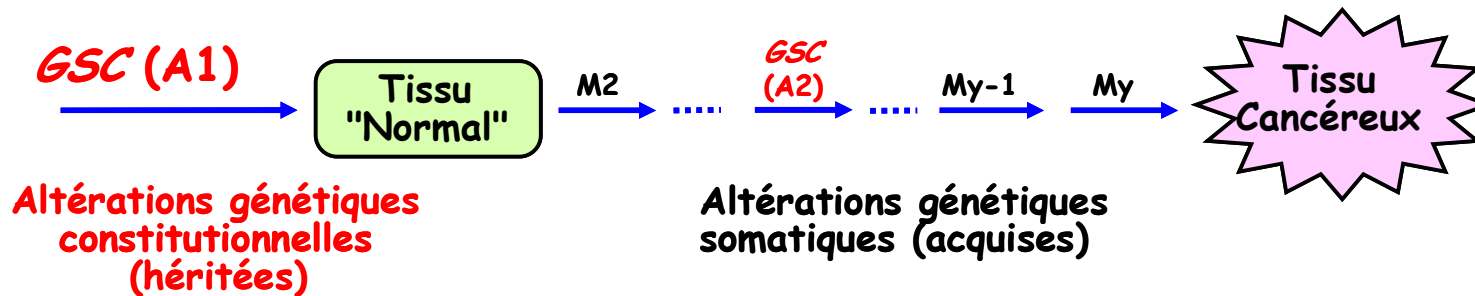
BIO-PATHOLOGIE

Hétérogénéité moléculaire

TUMEURS SPORADIQUES (90%)



TUMEURS HEREDITAIRES (10%)

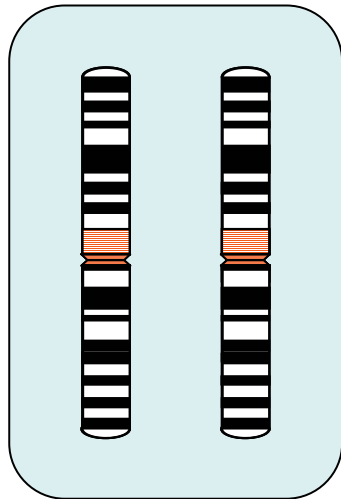




BIO-PATHOLOGIE

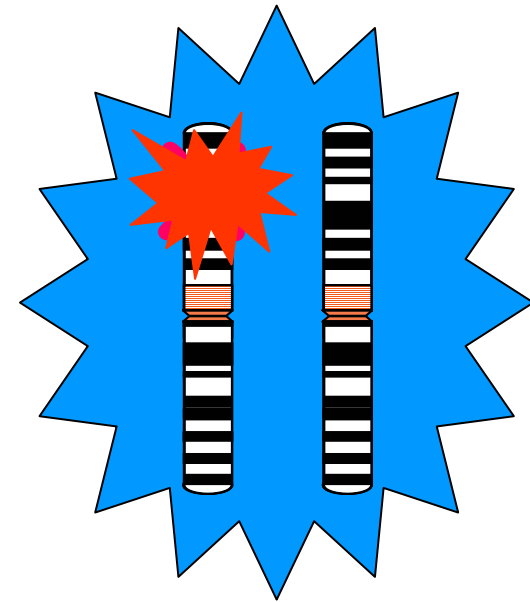
Hétérogénéité moléculaire

Oncogènes



Cellule normale

- Mutation ponctuelle
- Amplification génique
- Translocation chromosomique
- Insertion virale



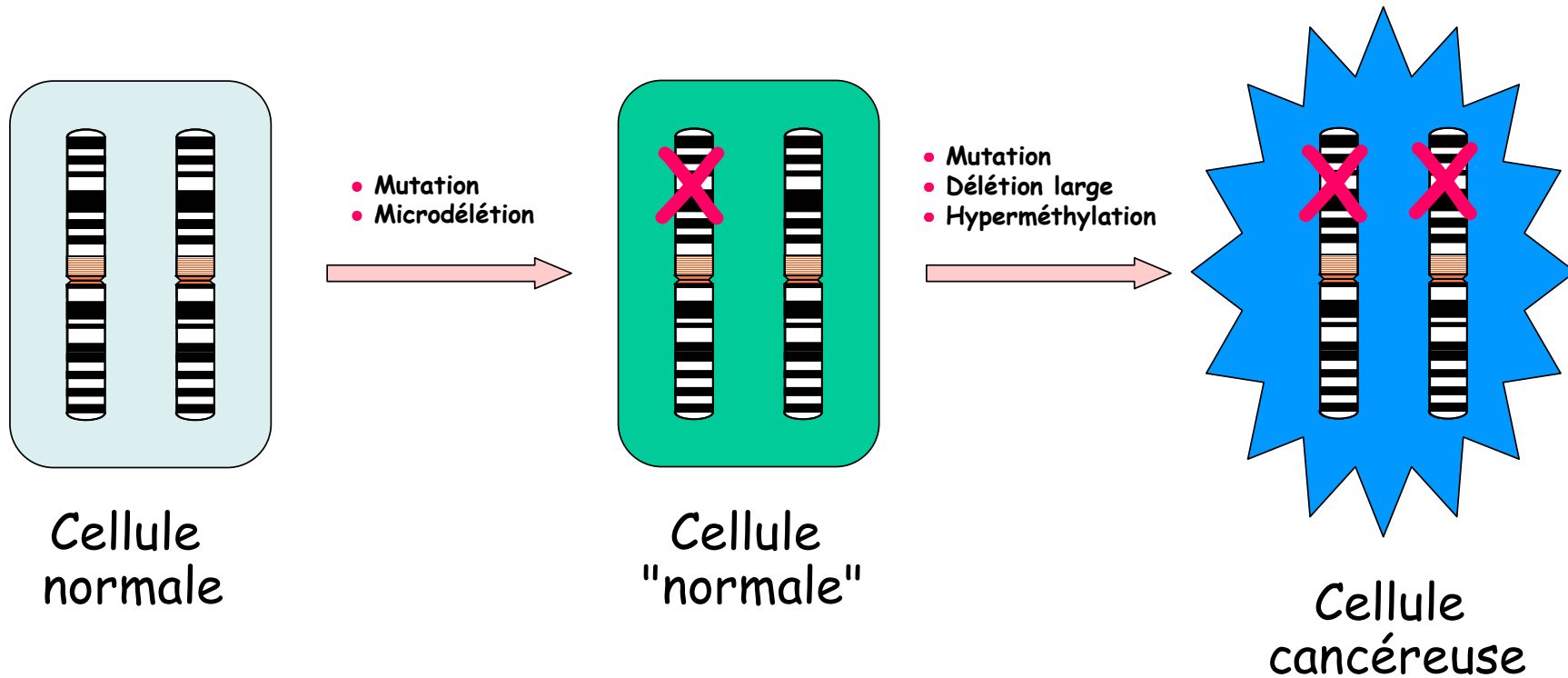
Cellule cancéreuse



BIO-PATHOLOGIE

Hétérogénéité moléculaire

Gènes suppresseurs

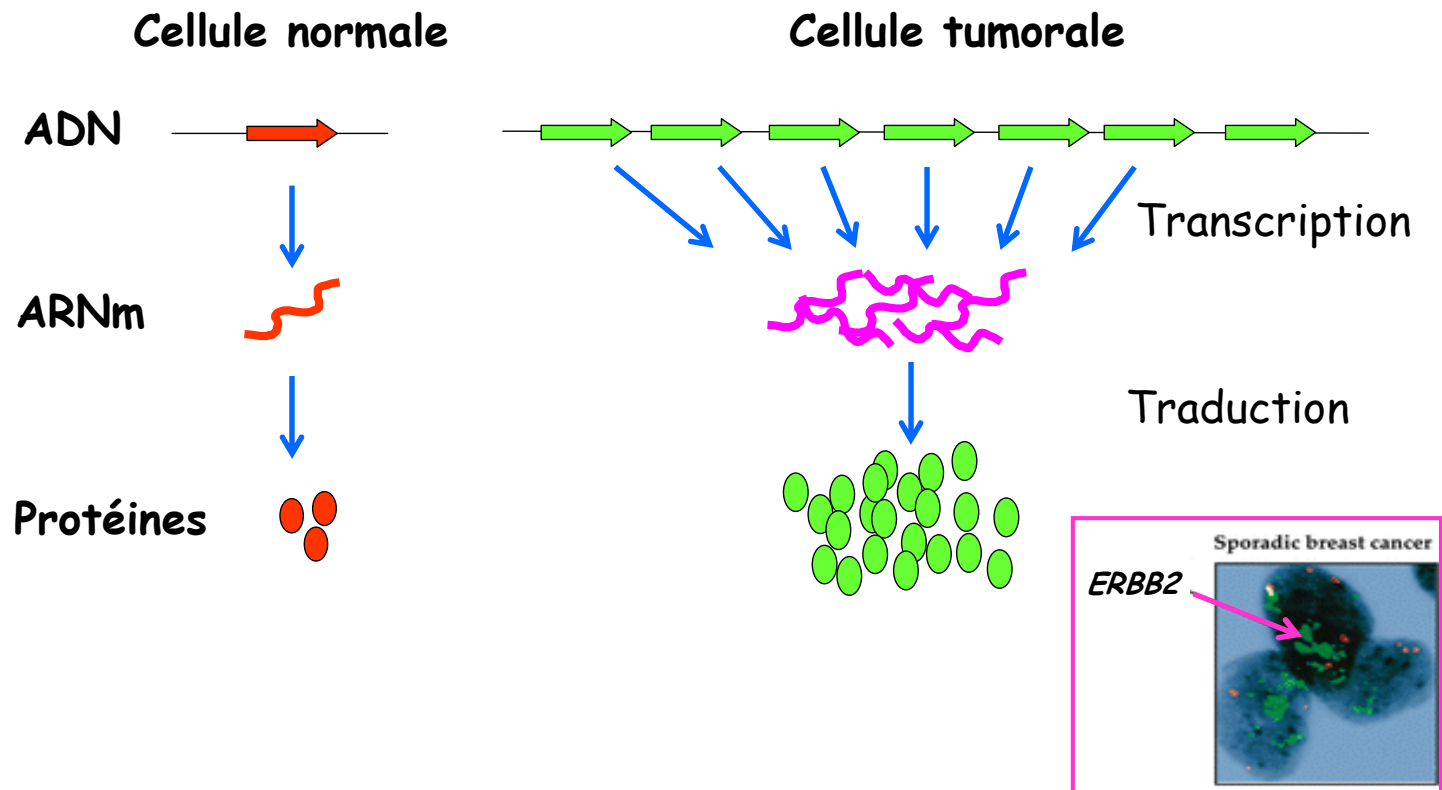




BIO-PATHOLOGIE

Stratégies d'analyse

Altération quantitative - Ex : amplification génique

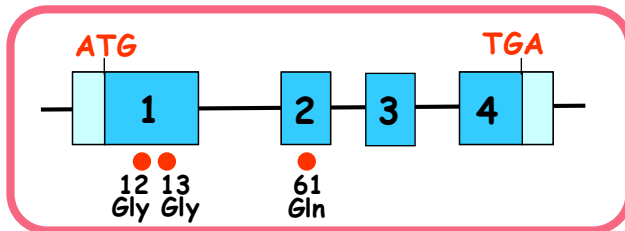
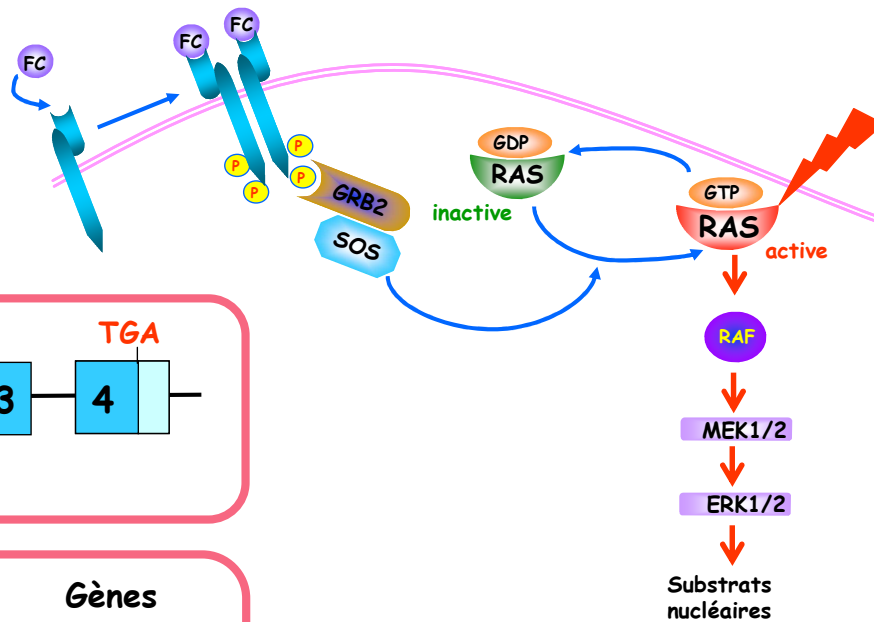




BIO-PATHOLOGIE

Stratégies d'analyse

Altération qualitative - Ex : mutation ponctuelle



Cancer	Mutations	Gènes
Pancréas	90%	<i>KRAS</i>
Colon	45%	<i>KRAS</i>
Mélanome	15%	<i>NRAS</i>
Sein	-	-

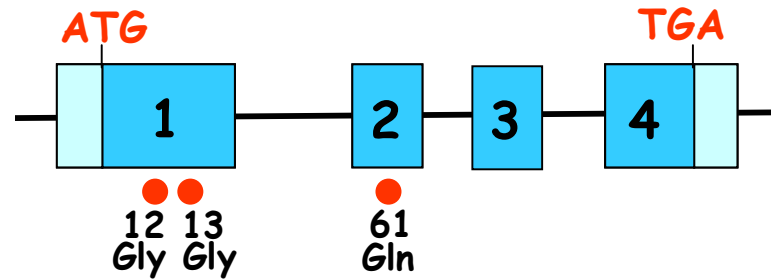
Gènes *KRAS*, *HRAS* et *NRAS*



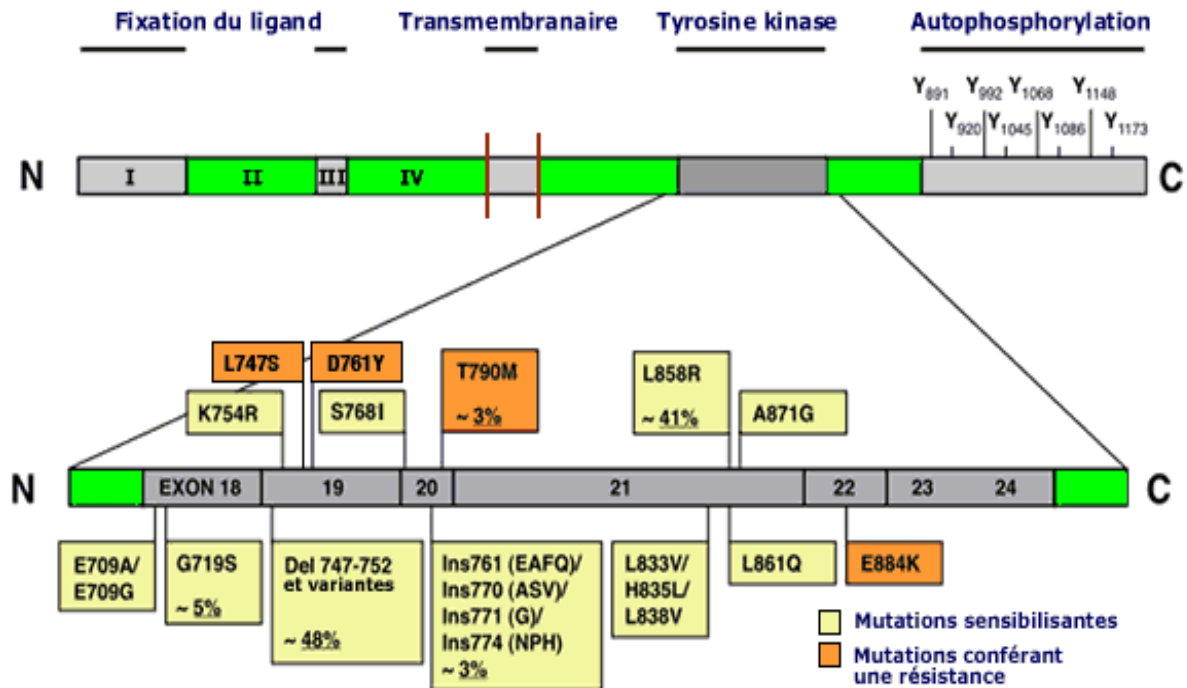
BIO-PATHOLOGIE

Stratégies d'analyse

KRAS



EGFR



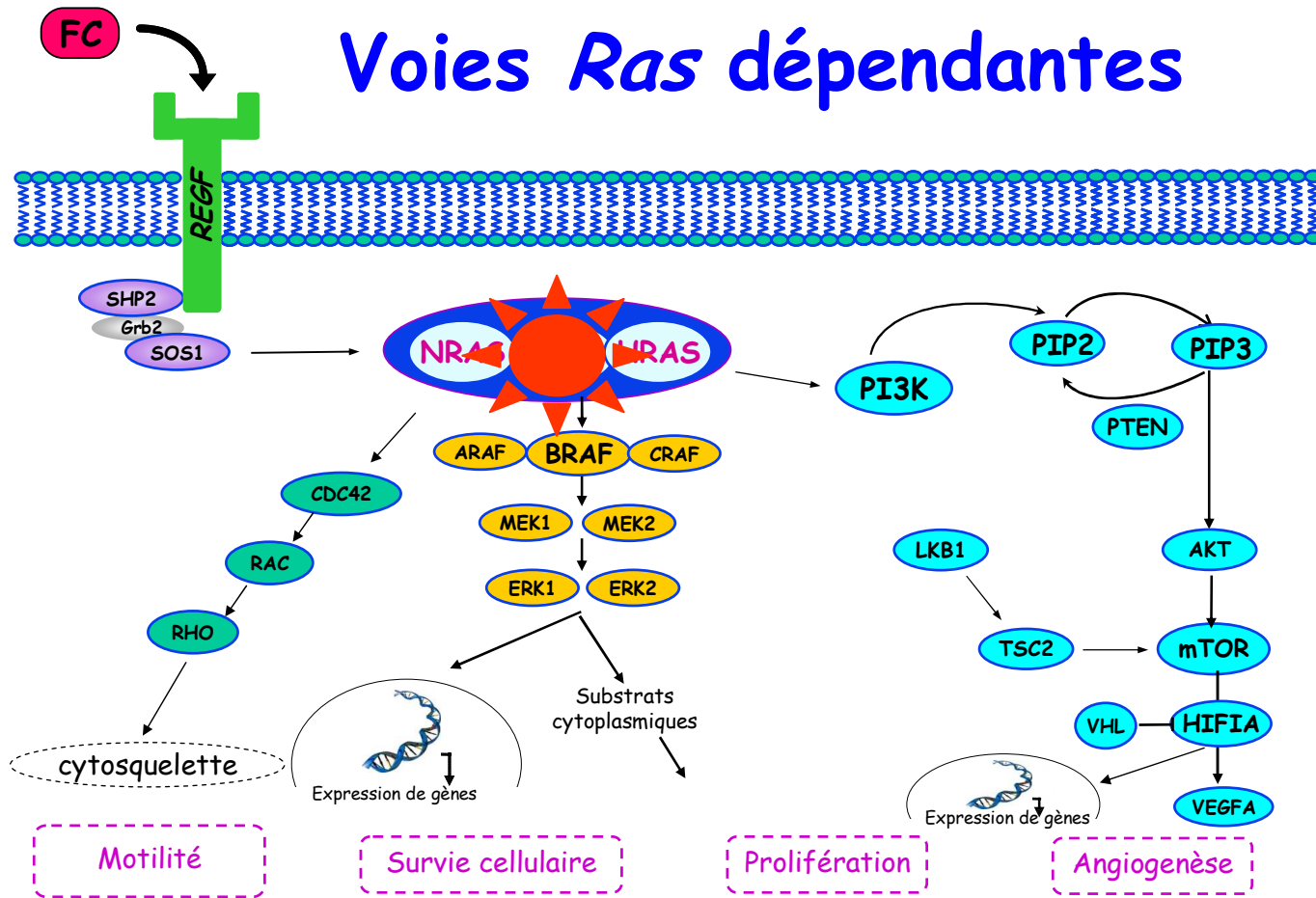
Graphique adapté et complété à partir de Imer et al. *Oncogene* (2007) 26 : 5693



BIO-PATHOLOGIE

Stratégies d'analyse

Voies Ras dépendantes



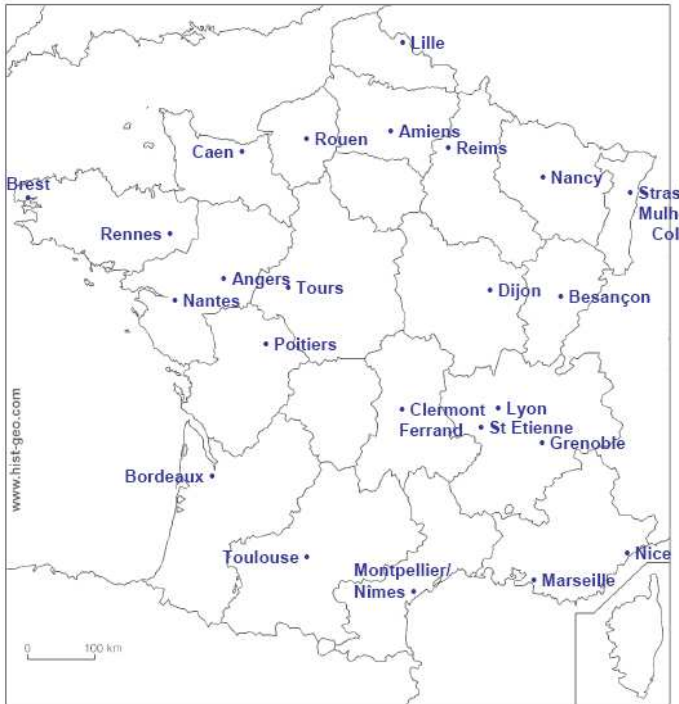


ORGANISATION



ORGANISATION

Plateformes régionales



Plates-formes retenues en 2006
et en 2007

Plateforme HUVEGEN
(Dr Bièche)

HOPITAL RENE HUGENIN – ST CLOUD
Laboratoire d'oncogénétique
Service d'anatomopathologie

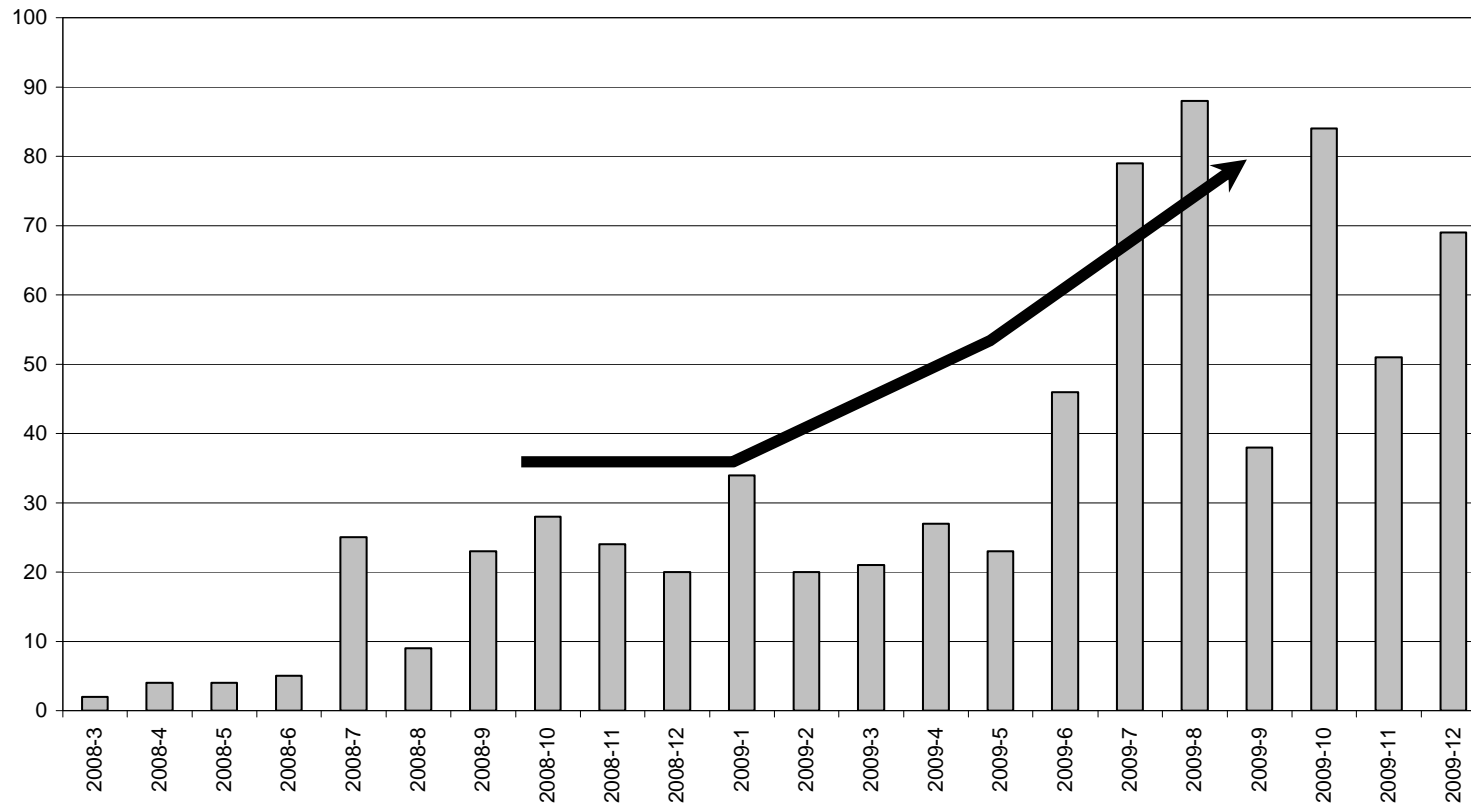
HOPITAL MIGNOT - VERSAILLES
Laboratoire de cytogénétique
Laboratoire de biologie moléculaire



ORGANISATION

Activité en forte croissance

Nombre de demandes *KRAS* par mois





ORGANISATION

Plateforme HUVEN

- Croissance de l'activité depuis mars 2008
 - KRAS : 760 – BRAF: 22 Fin 2009 : 510 mutations *KRAS-BRAF*
 - 73 MSI
 - 21 EGFR (1/12/09) – 46 (15/01/10)
- Délai de rendu << génétique germinale
 - Analyse BRCA1/BRCA2 : 6 mois
 - Analyse KRAS : 15 jours
 - Analyse EGFR < 15 jours
- Niveau de qualité = génétique germinale
 - National, STIC, Pr PL Puig
 - Européen, EQA, Pr E Dequeker et Pr H van Krieken
 - HUVEGEN/HEGP : Organisation du contrôle qualité européen
- Hétérogénéité des pratiques
 - Non contributifs : 10-20%
- Activité de développement pour préparer les nouveaux tests



ORGANISATION

Plateforme HUVEN



British Journal of Cancer (2008) 99, 2100

© 2008 Cancer Research UK All rights reserved 0007-0920/08 \$32.00

www.bjcancer.com

Letter to the Editor

KRAS mutation status in colorectal cancer to predict response to EGFR targeted therapies: the need for a more precise definition

E Rouleau^{*,1}, F Spyrtos¹, B Dieumegard², JM Guinebretière³, R Lidereau¹ and I Bièche¹

¹Oncogenetic Laboratory, INSERM U 735, Centre René Huguenin, Saint Cloud, France; ²Department of Medicine, Gastroenterology, Centre René Huguenin, Saint Cloud, France; ³Department of Pathology, Centre René Huguenin, Saint Cloud, France

British Journal of Cancer (2008) 99, 2100. doi:10.1038/sj.bjc.6604815 www.bjcancer.com

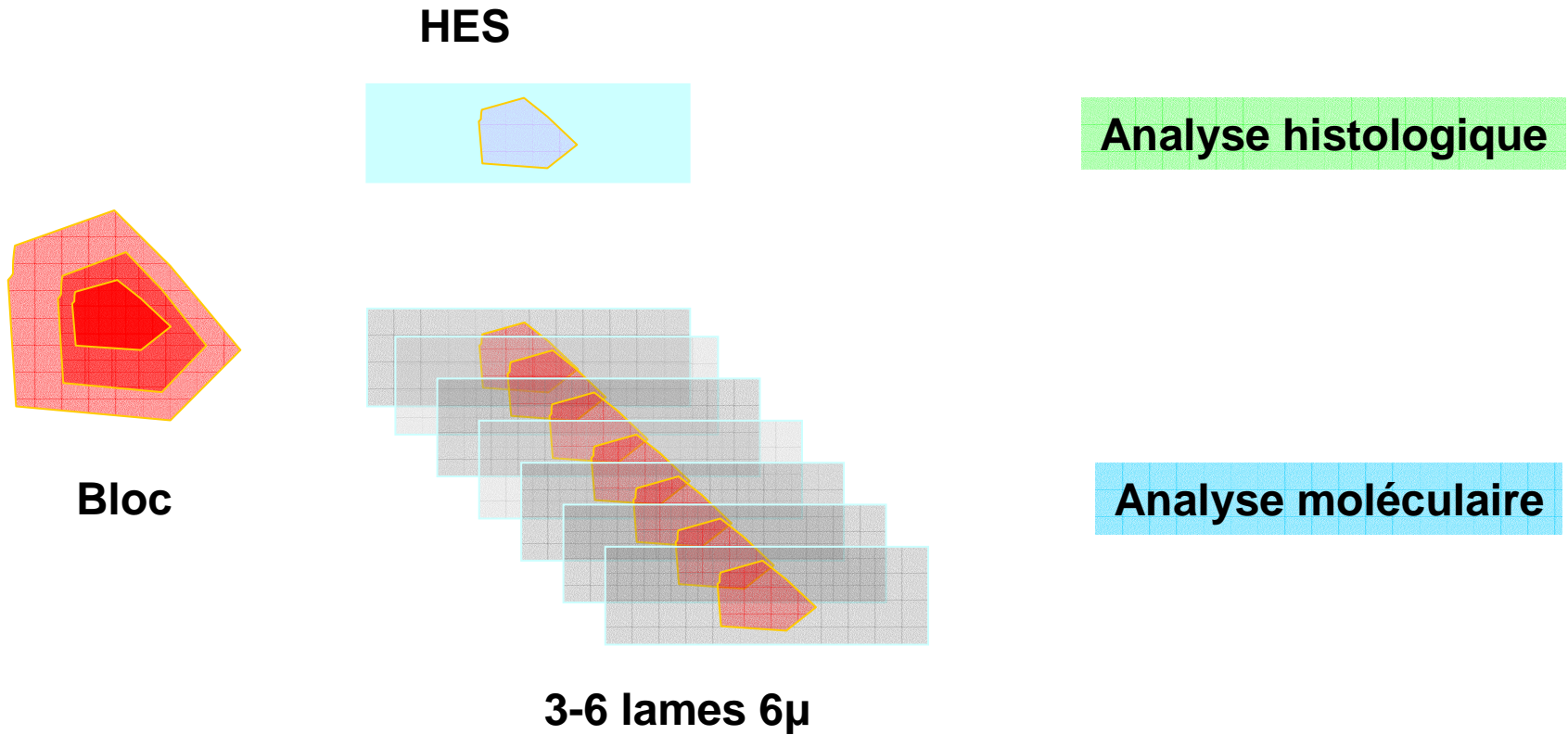
© 2008 Cancer Research UK



EN PRATIQUE
Criblage moléculaire
KRAS
EGFR

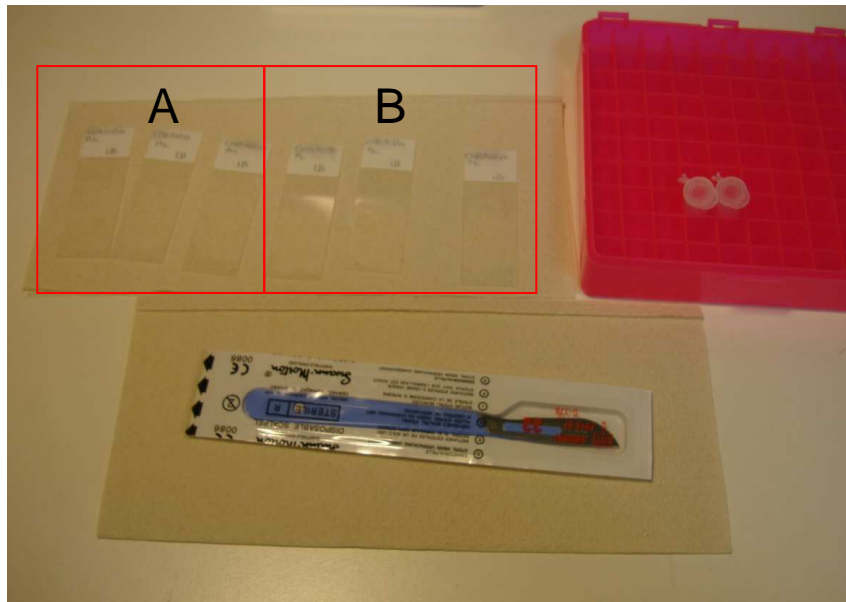


Parcours des prélèvements





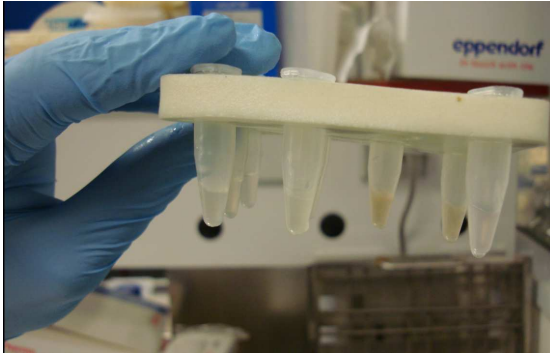
1) Réception des lames



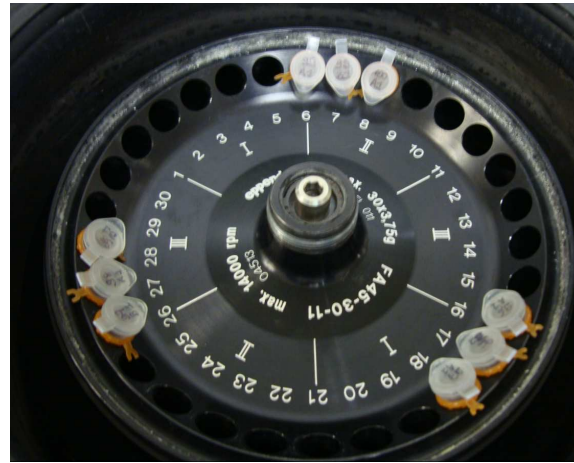
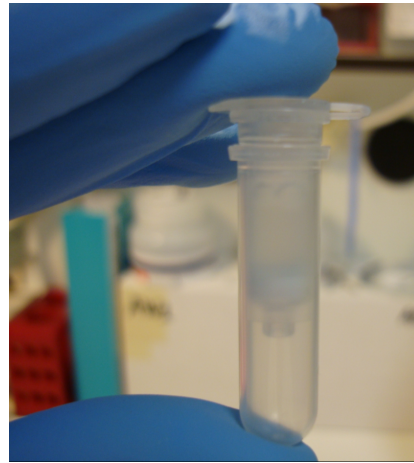
Grattage et aliquotage



Digestion enzymatique
56°C



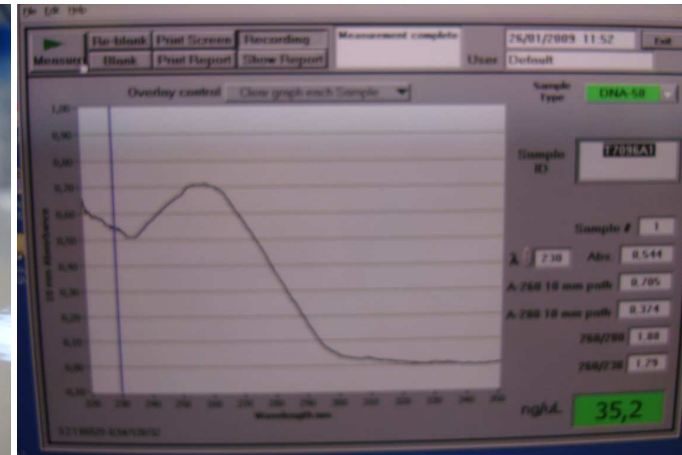
2) Extraction d'ADN



**Extraction sur colonne Qiagen®
50 à 200µL d'éluat**



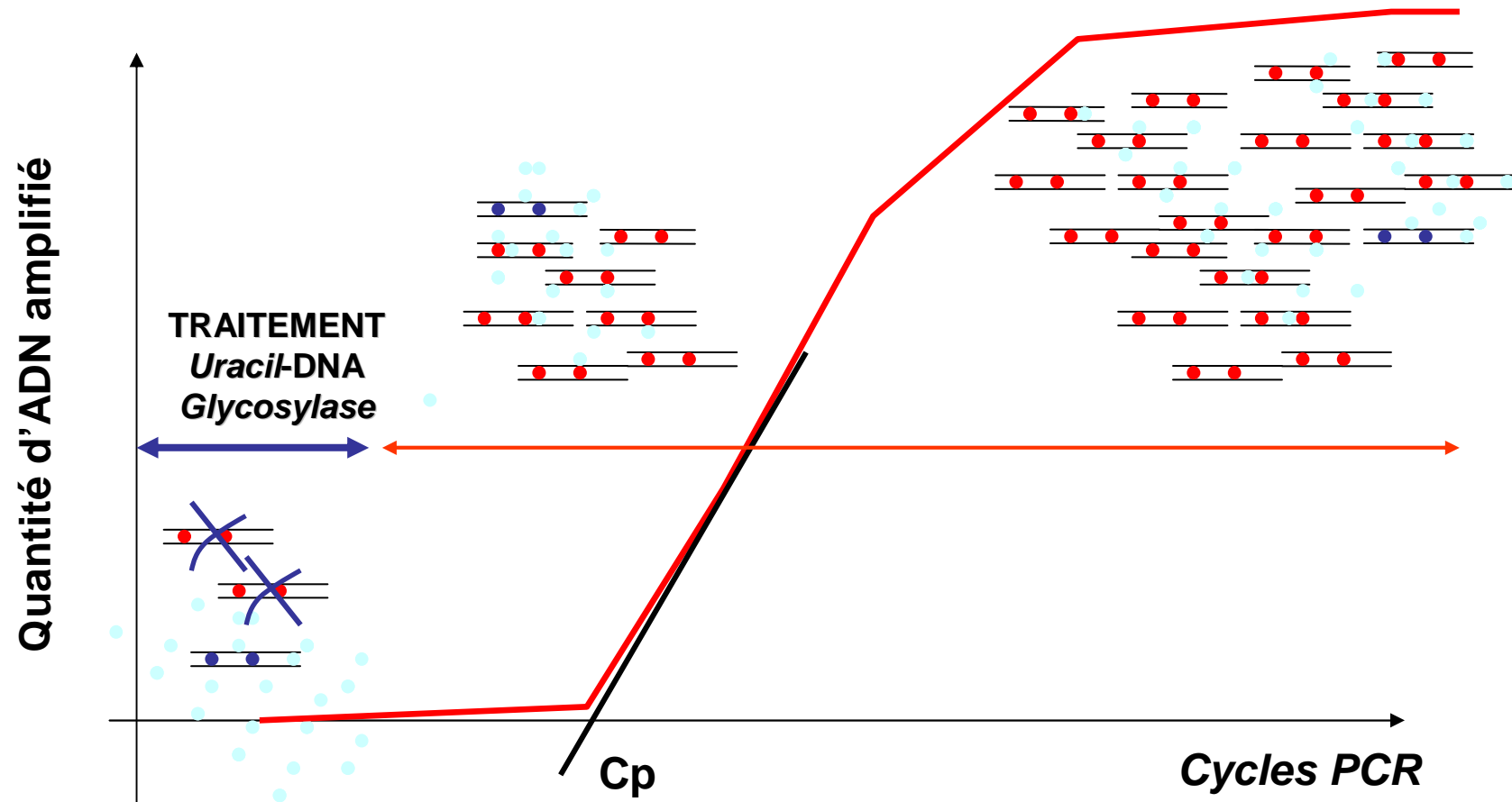
3) Dosage et stockage



Dosage de l'ADN et stockage en **4 aliquots congelés à -20°C** .

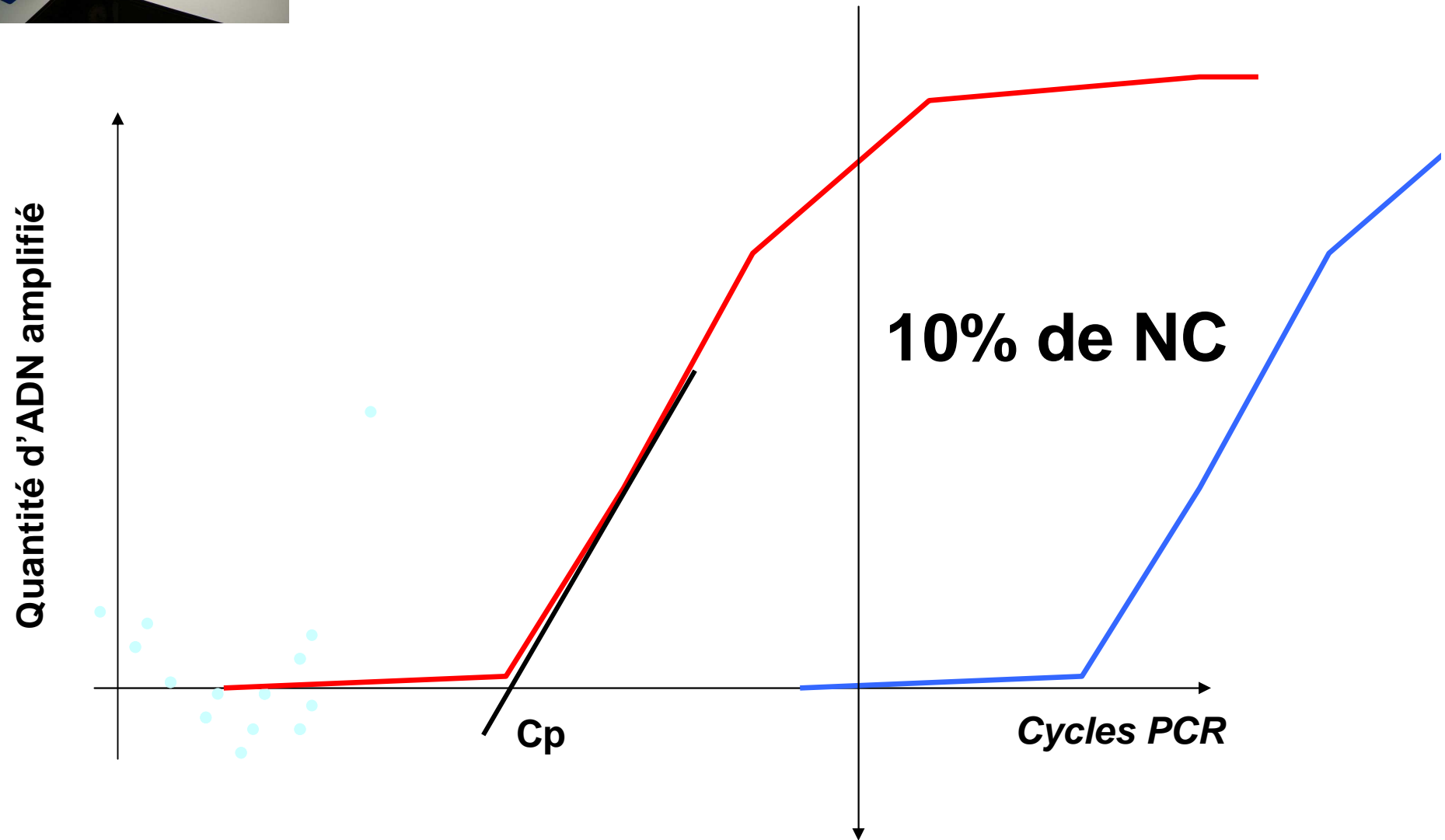


Base technique PCR



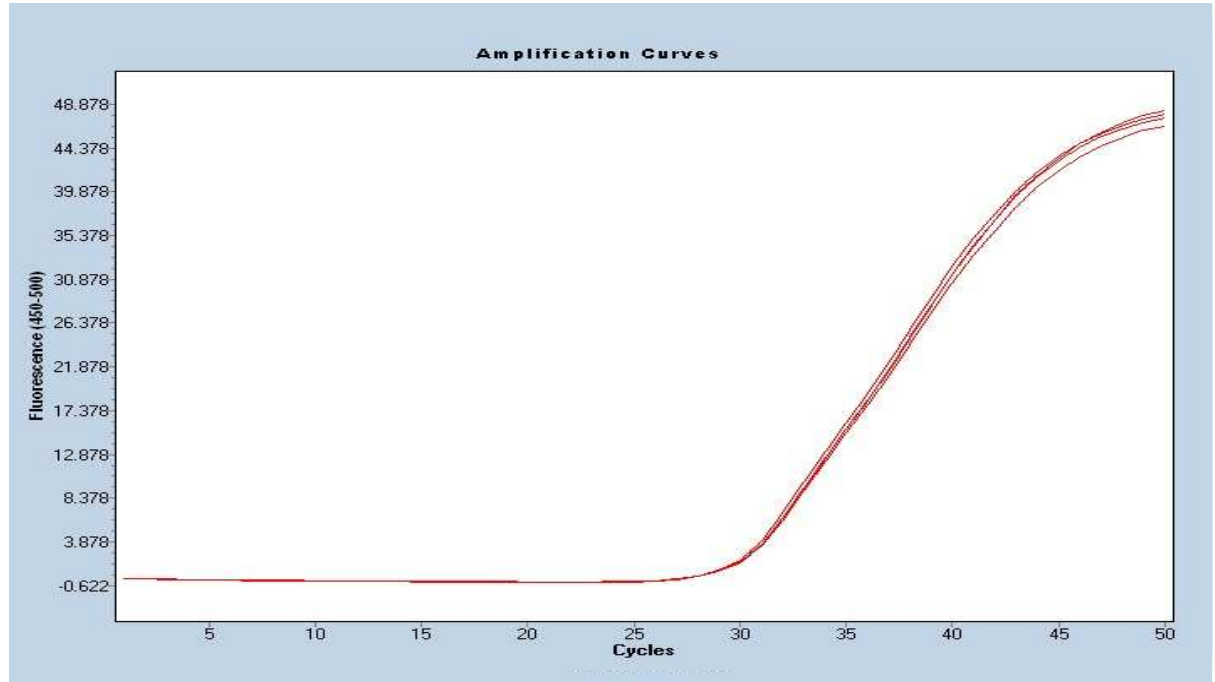
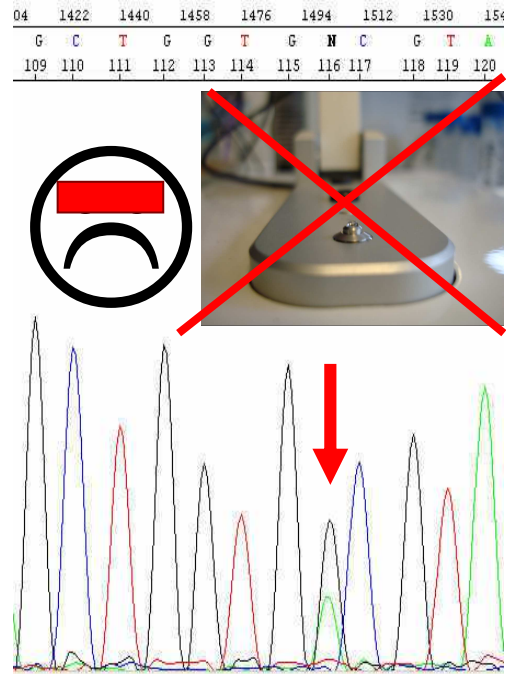


Non contributifs (NC)





Importance de la qualité



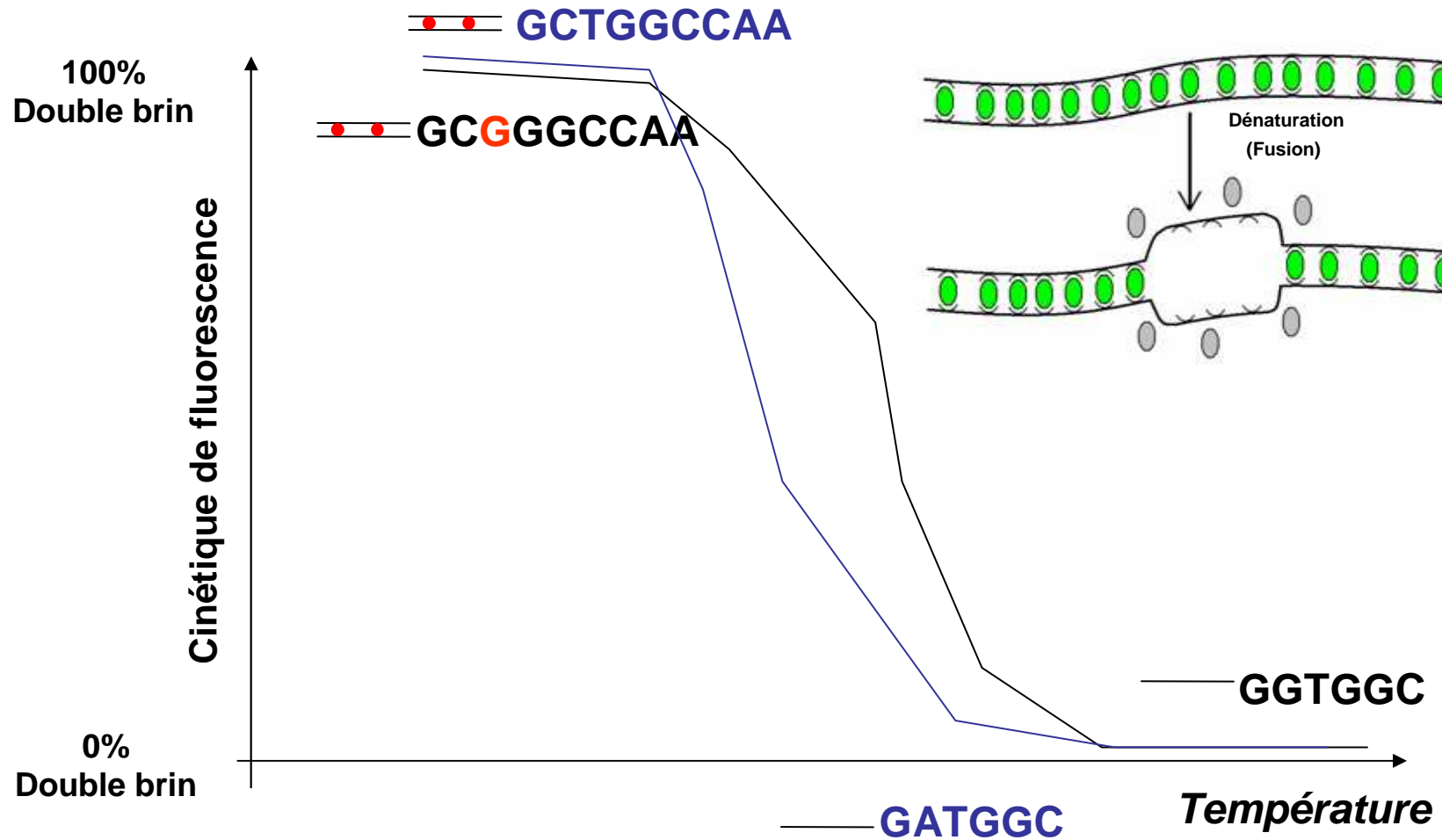


Méthodes d'analyse

- HRM
- SNAP Shot
- Pyroséquençage
- Taqman
- Séquençage direct

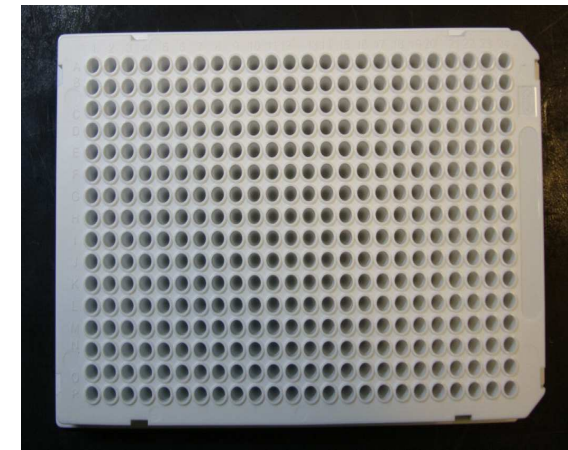
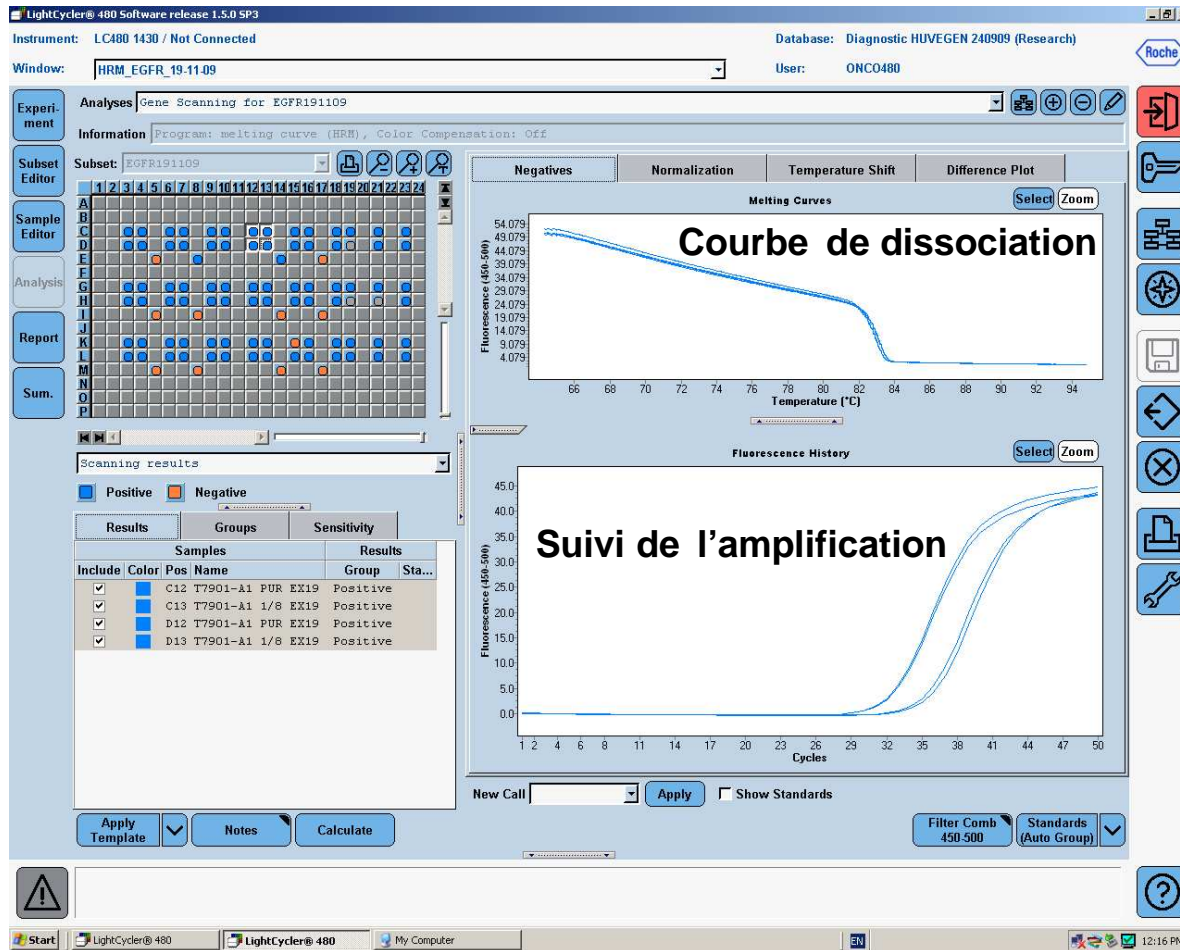


Base technique HRM – Courbe de fusion





4) Criblage en HRM



Plaque de 384 puits

Résultat en 1h30



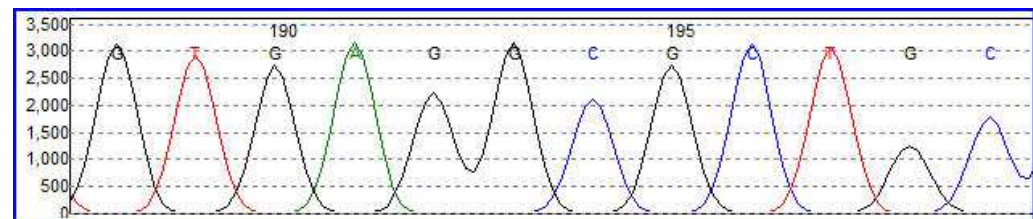
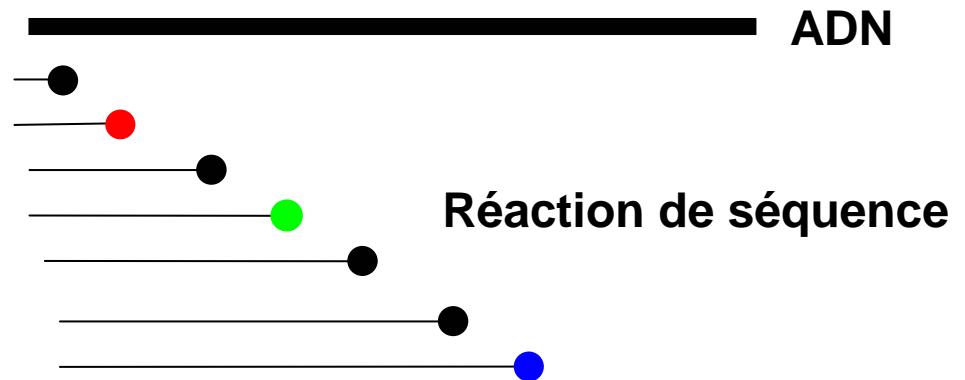
5) Confirmation en séquençage

Cp < 35

6 PCR = même profil



Séquençage d'une PCR
par aliquot





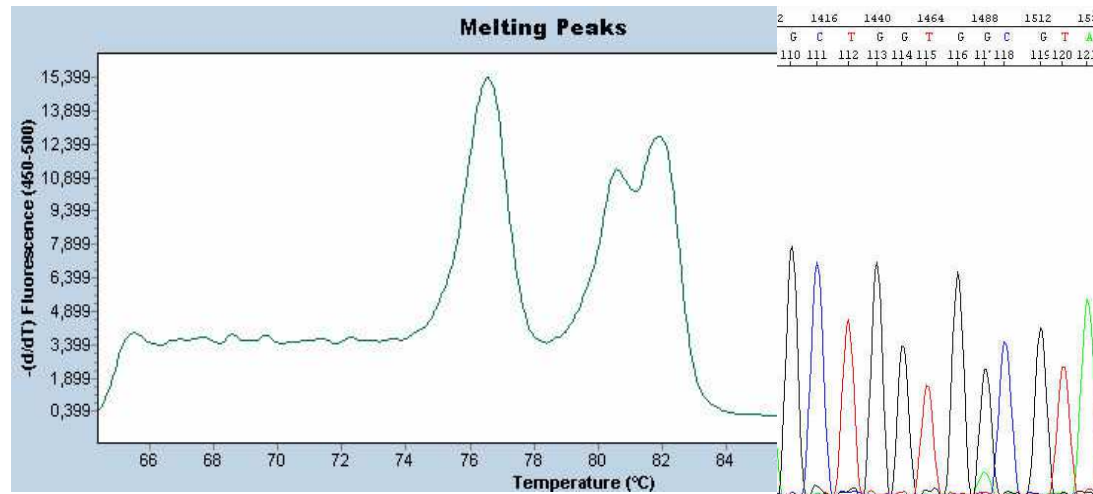
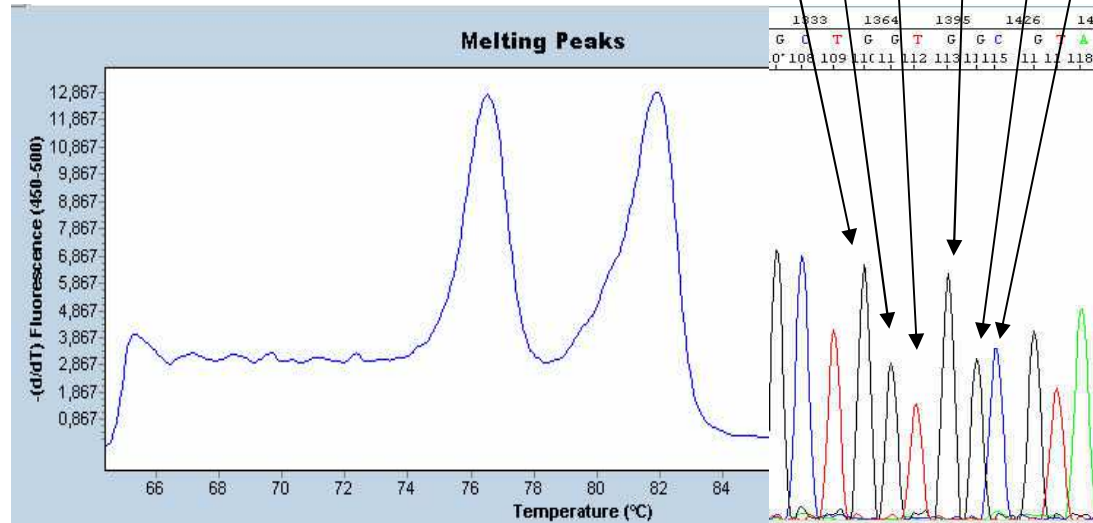
KRAS - Exon 1

Normal

10%

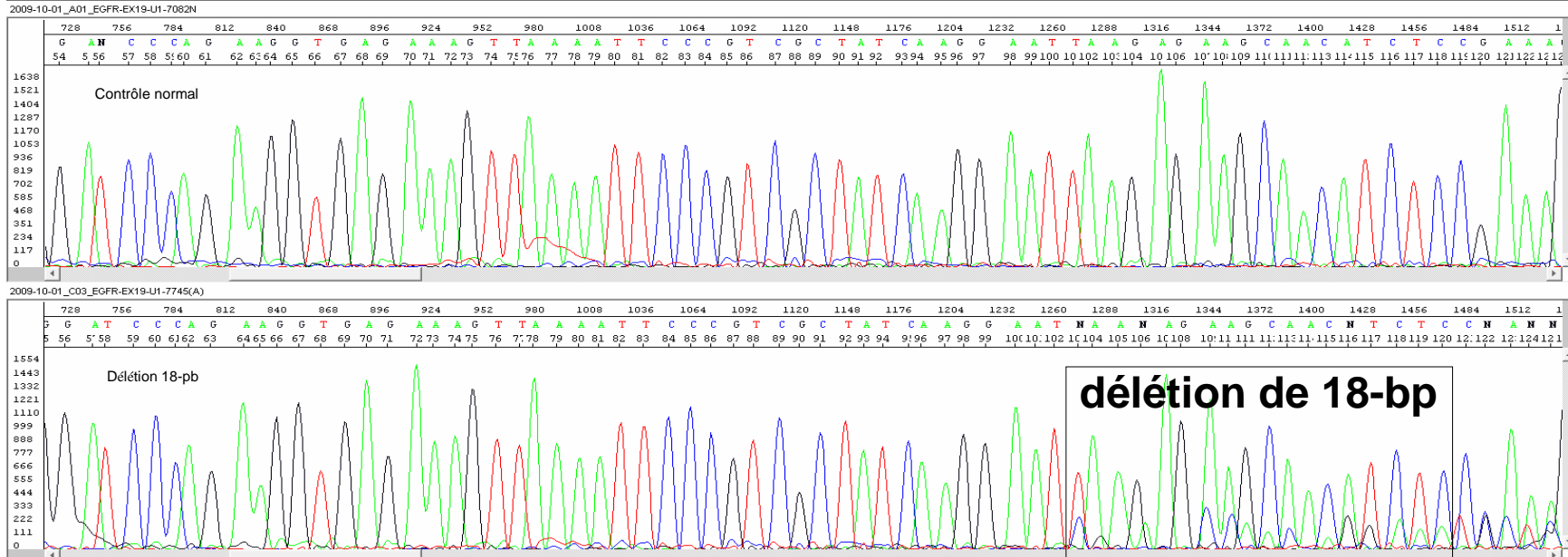
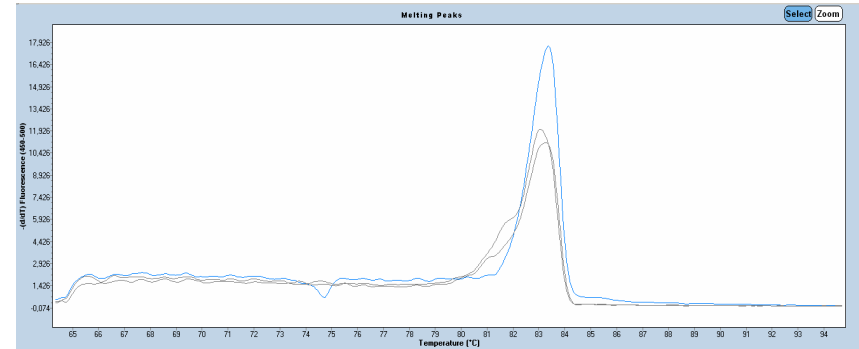
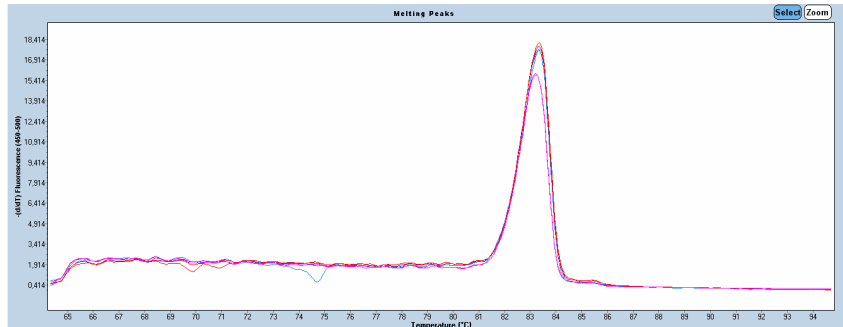
34 35 38

GGT GGC



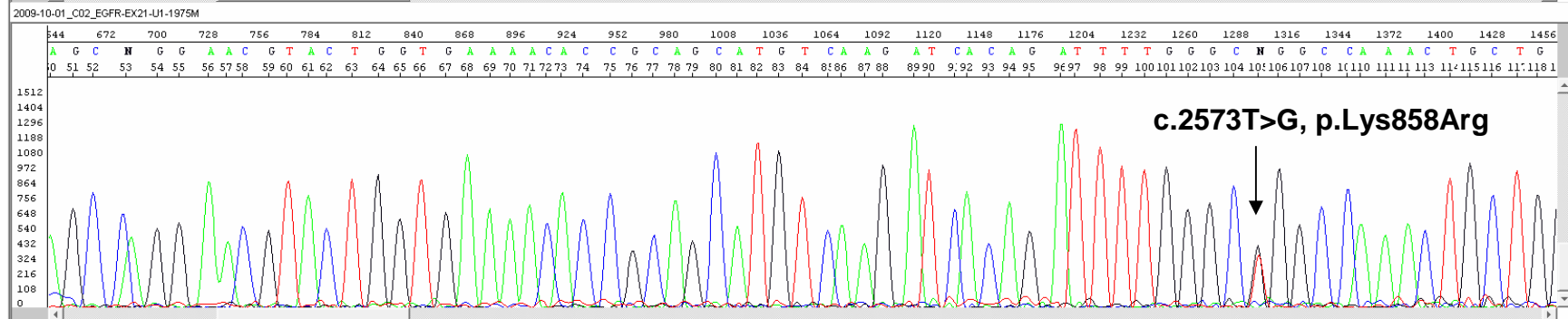
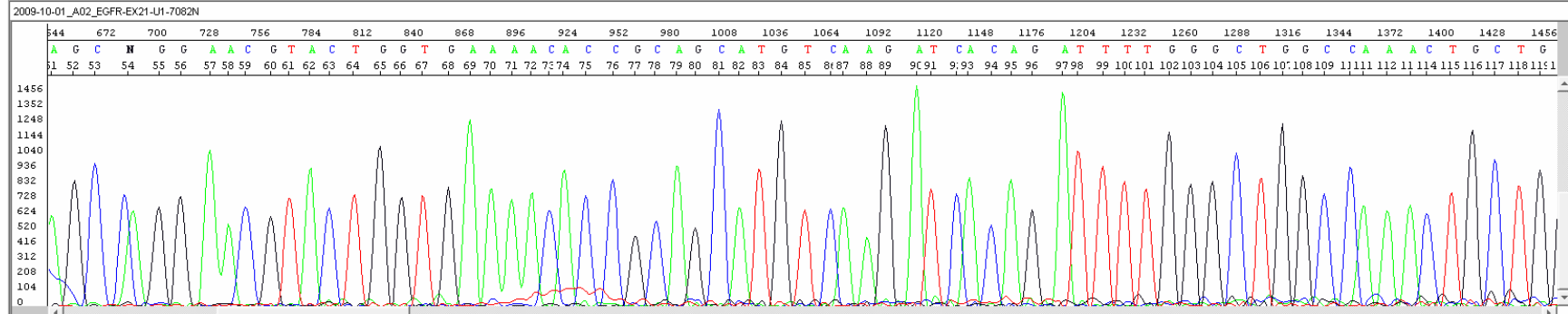
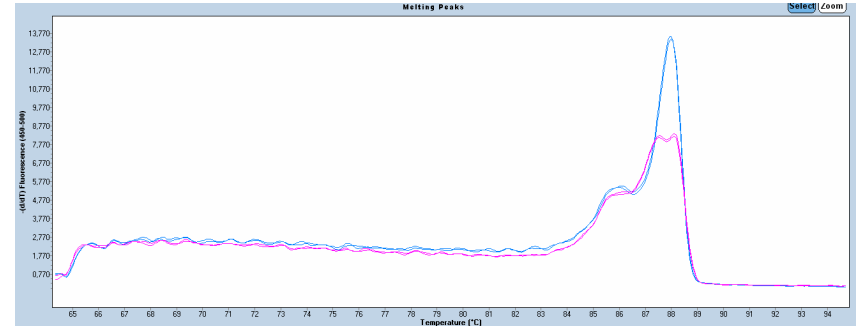
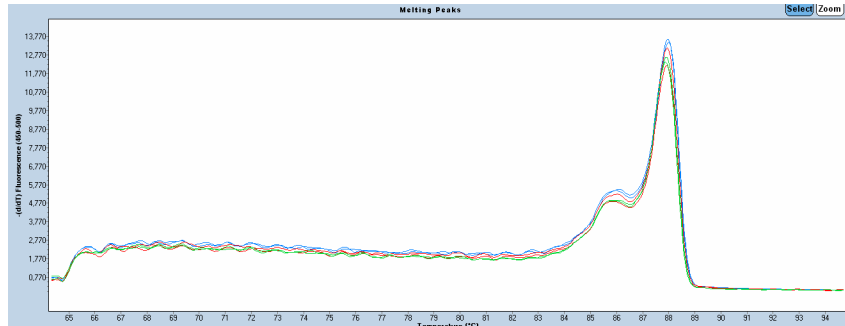


EGFR - Exon 19





EGFR - Exon 21





DEVELOPPEMENTS

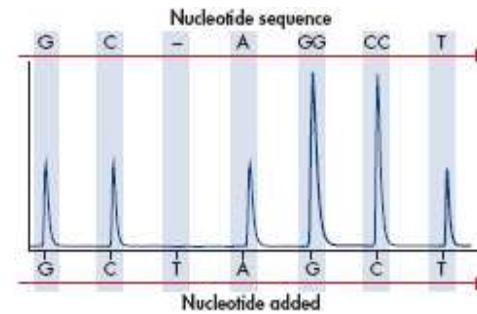
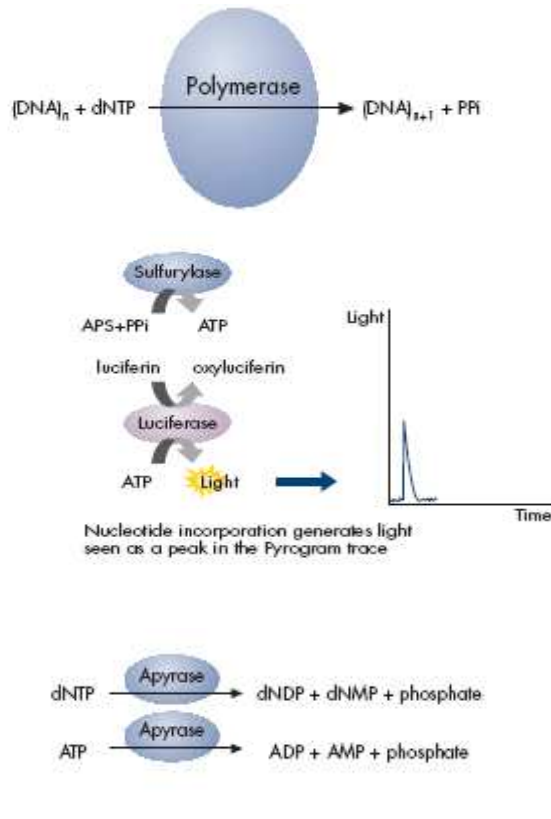
Amélioration technologique

Nouveaux tests



DEVELOPPEMENTS

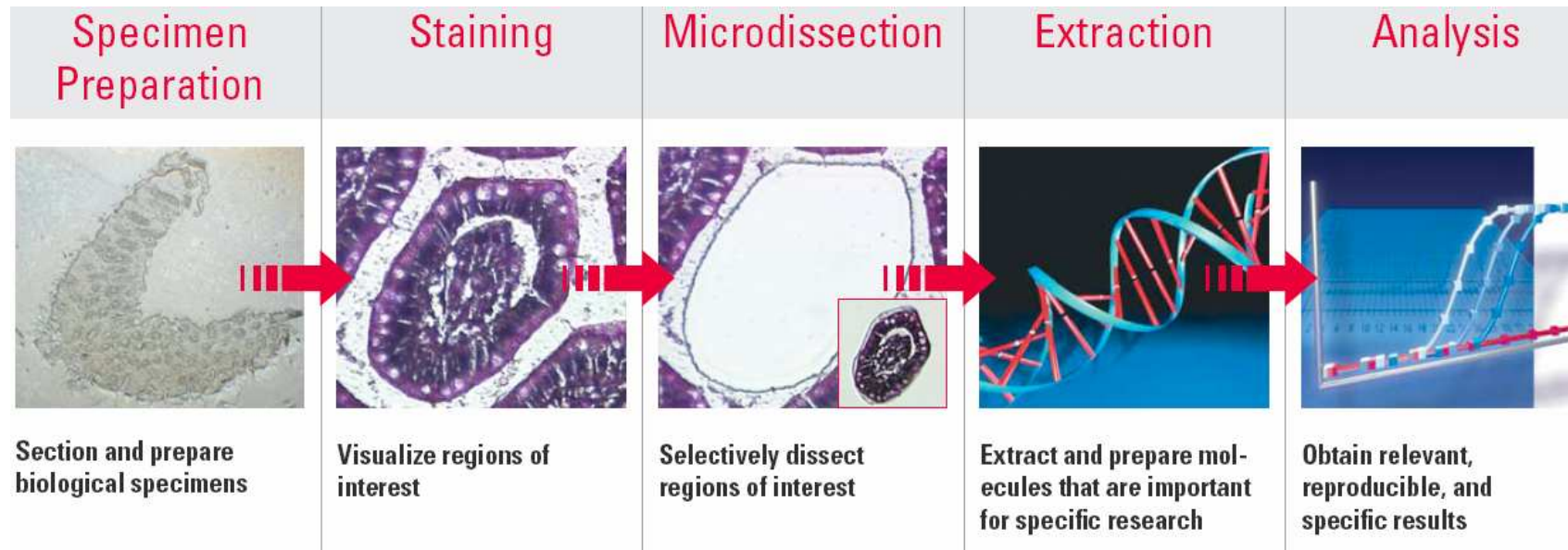
Autres méthodes : pyroséquençage





DEVELOPPEMENTS

Autres approches : microdissection

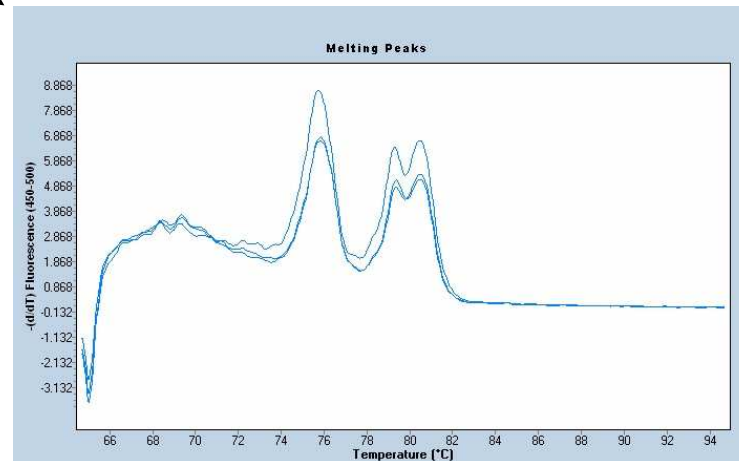
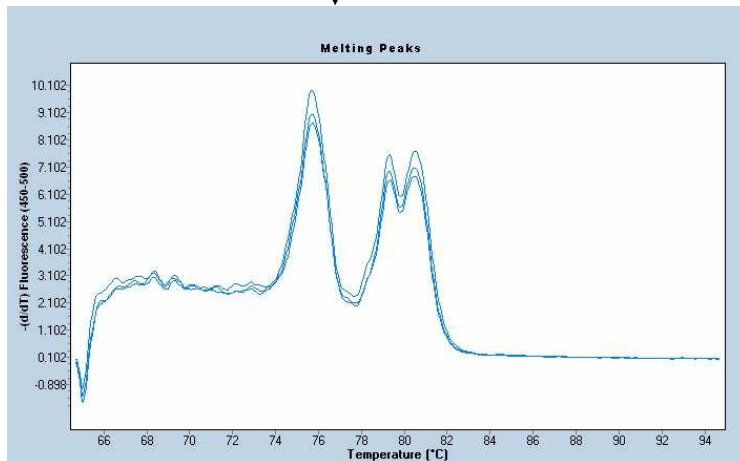
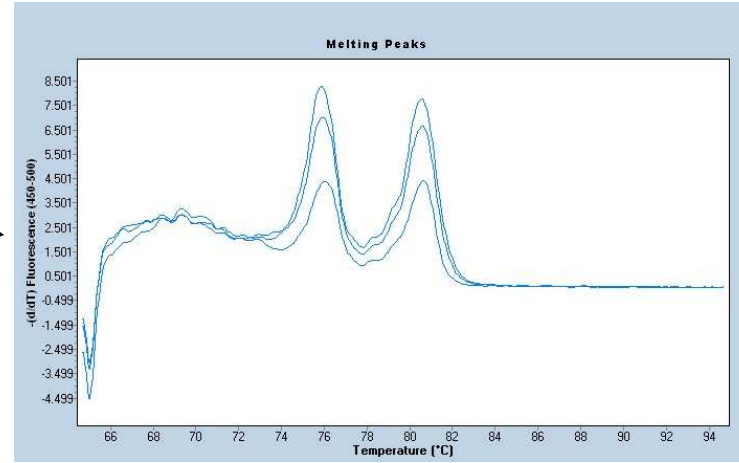
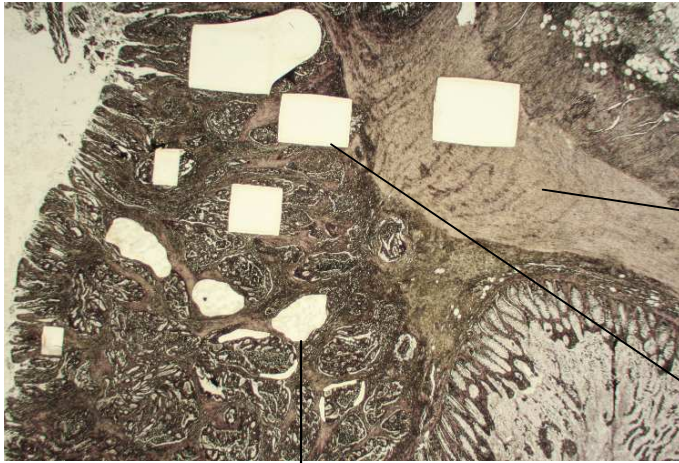


Leica, May 2009



DEVELOPPEMENTS

Autres approches : microdissection





CONCLUSION



Conclusion

- Enjeux du diagnostic somatique
 - Événements récurrents
 - Hétérogénéité des tumeurs
 - Hétérogénéité des pratiques (anapath/BM)
 - Délais de rendu <<< génétique constitutionnelle
 - Niveau de qualité identique
- Conséquences
 - Impact organisationnel
 - Nécessité d'un développement continu



Remerciements

Centre René Huguenin

ONCOGENETIQUE

Nicolas Delanoy et Lionel Mathys

Ivan Bièche

Rosette Lidereau

Frédérique Spyrtos

Cédric Lefol

Christophe Guy

Marie Piccot

Florence Copigny

Frédérique Maraone

GASTROENTEROLOGIE

Benoît Rousseau

Barbara Dieumegard

Frédérique Cvitkovic

ANATOMOPATHOLOGIE

Didier Meseure

Jean-Marc Guinebretière

Martine Trassard